



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PRODUÇÃO DE LACASES POR *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18
UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA

RECIFE

2022

JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA

**PRODUÇÃO DE LACASES POR *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18
UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Co-orientadora: Dra. Juanize Matias da Silva Batista.

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383p Ferreira, Julyanne Victória dos Santos Ferreira
PRODUÇÃO DE LACASES POR *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 UTILIZANDO
SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS / Julyanne Victória dos Santos Ferreira Ferreira. - 2022.
59 f. : il.

Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Coorientadora: Juanize Matias da Silva Batista.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. Enzima ligninolítica . 2. Fungo. 3. Fermentação . I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Batista,
Juanize Matias da Silva, coorient. III. Título

CDD 574

JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA

**PRODUÇÃO DE LACASES POR *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18
UTILIZANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

Comissão Avaliadora:

Ana Lúcia Figueiredo Porto
Prof^a Dr^a – UFRPE
Orientadora

Márcia Nieves Carneiro da Cunha
Dr^a– UFRPE
Membro Titular

Marllyn Marques da Silva
Dr^a– UFRPE
Membro Titular

Anna Gabrielly Duarte Neves
M.Sc– UFRPE
Suplente

RECIFE

2022

A Deus que me deu forças, sabedoria e coragem para superar todos os obstáculos e concluir este ciclo com muito aprendizado. A minha mãe, Júlia, por ter vencido e sonhado cada fase dessa jornada comigo e ao meu avô, Antônio “*in memoriam*” por todo amor, carinho e cuidado paternal ao longo de toda a minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus autor da minha vida, por ter me sustentado todos os dias ao longo dessa caminhada, a minha mãe, Júlia, por ser meu alicerce e porto seguro além de ser a minha maior motivação, a minha avó Maria Júlia e ao meu avô Antônio “*in Memoriam*” por terem me ensinado os valores da vida, por sempre incentivarem e apoiarem meus estudos, registro o meu agradecimento especial ao meu avô por todo amor e cuidado paternal que sempre esteve comigo, inclusive por ter passado boa parte da minha graduação me esperando chegar em casa, mesmo que muitas vezes bem próximo das 00:00h, muito obrigada, Vô. Ao meu pai, Valdir, por se fazer presente nesta fase da minha vida. As minhas tias Elza, Eronilda e Edilene por todo cuidado, carinho e suporte comigo desde a infância. Agradeço também às minhas primas Elizandra, Jacilayne, Amanda e Maria Fernanda que são verdadeiras irmãs e estiveram me apoiando ao longo deste ciclo, lembro-me bem que Jacilayne foi quem fez todas as minhas inscrições nos vestibulares e o quanto eu precisei da ajuda de Elizandra assim que iniciei na jornada científica para me ensinar a fazer as referências do projeto, eu não teria chegado aqui sem vocês. As minhas tias do coração Jácia e Jacira, a minha madrinha Girlandia e o meu padrinho Wagner. A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por ter me acolhido nessa jornada da graduação, por ser uma instituição pública de qualidade, com excelentes profissionais que foram fundamentais para a minha formação. A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo fomento que permitiu a realização deste trabalho. A todos do Labtecbio que me acolheram desde 2019, Karol, Jéssica, Vivi, Clara e Micheline, em especial a Juanize e Gaby, pelos ensinamentos ao longo de todo esse tempo, pelas vezes que ficaram até tarde da noite comigo no laboratório, a disponibilidade e parceria de vocês foram fundamentais na realização deste trabalho, a Thiago Pajeú por sua presença logo no início das minhas apresentações científicas, ele estava em todas, sempre incentivando, apoiando e tirando dúvidas e por fim agradeço ao Professor Romero e a Professora Ana pelas sábias ideias compartilhadas nas reuniões, por toda disponibilidade que foram essenciais para a execução deste trabalho, além de todo o ensinamento e aprendizagem que obtive.

Muito obrigada!

Não tenho nada além de um sonho e uma
inesgotável fé, isso me faz insistir em estar aqui.
Você sabe eu quero fazer mais que apenas viver...

Nívea Soares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Colônia do <i>Aspergillus janus</i> URM 4456 em meio BDA.....	17
Figura 2 – Colônia do <i>Aspergillus</i> sp. em meio BDA.....	18
Figura 3 – Colônia do <i>Aspergillus</i> sp. em meio BDA.....	18
Figura 4 – Colônia do <i>Aspergillus flavus</i> em meio BDA	18
Figura 5 – Colônias do <i>Aspergillus serratalhadensis</i> em meio BDA com 48h de inóculo e com 7 dias de inóculo	19
Figura 6 – Micélios vegetativos do <i>Aspergillus serratalhadensis</i>	20
Figura 7 – Hifas hialinas e cenocíticas do <i>Aspergillus serratalhadensis</i> e corpos de frutificação	21
Figura 8 – Hifas do <i>A. serratalhadensis</i> com bastante substância de reserva em seu citoplasma e esporos em cadeia	21
Figura 9 – Sítios ativos de cobre em uma lacase fúngica	27
Figura 10 – Esquema do ciclo catalítico das lacases	29
Figura 11 – Esquema da reação de lacase	29
Figura 12 – <i>Aspergillus serratalhadensis</i> em diferentes meios de cultura	34
Figura 13 – Teste de aborção dos substratos.....	35
Figura 14 – Halo formado pelo <i>A. serratalhadensis</i> URM 79/18.....	36
Figura 15 – <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 na FES com o substrato de farelo de trigo	37
Figura 16 – <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 na FES com o substrato de casca de macaxeira.....	37
Figura 17 – <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 na FES com o substrato de casca de laranja.....	38
Figura 18 – Adição de água destilada após 72h de FES do <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 para obtenção do extrato bruto.....	39
Figura 19 – Filtração a vácuo para separação da biomassa fúngica do extrato bruto.....	39
Figura 20 – Extratos bruto obtidos com a FES da linhagem fúngica <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18	40
Figura 21 – Fermentação Submersa do <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 no substrato de farelo de trigo.....	42
Figura 22 – Fermentação Submersa do <i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18 no substrato de farinha de soja.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais enzimas produzidas por <i>Aspergillus</i> spp.	23
Tabela 2 – Resultado das atividades de lacase em U/mL produzida pelo fungo <i>A. serratalhadensis</i> em fermentação em estado sólido	40
Tabela 3 – Resultado da fermentação submersa do <i>A. serratalhadensis</i>	44
Tabela 4 – Resultado da determinação de proteína total em mg/mL, referentes a fermentação em estado sólido do <i>A. serratalhadensis</i>	45
Tabela 5 – Resultado da determinação de proteína total em mg/mL, referentes a FS do <i>A. serratalhadensis</i>	45
Tabela 6 – Resultado das atividades de lacase em U/mL produzida pelo fungo <i>A. serratalhadensis</i> conforme metodologia de Ergun e Urek (2017).....	57
Tabela 7 – Determinação da atividade enzimática de Lacase em U/mL, em diferentes tempos de reação, conforme a metodologia de Kumar (2016).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔA Diferença entre a absorvância final e a inicial

ABTS Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

BDA Batata Dextrose Ágar

BOD Demanda Bioquímica de oxigênio (estufa incubadora de BOD)

CZ Ágar czapeck

ϵ Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

EMA Ágar Extrato de Malte

FES Fermentação em Estado sólido

FS Fermentação Submersa

mg miligramas

mm Milimetros

mM Milimolar

nm Nanometros

R Quantidade de caldo enzimático (L)

RPM Rotação por Minuto

SAB Ágar Sabouraud

T Tempo de reação (min)

V Volume da reação

U Unidades

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
2.1.2. Fungos: Quem são e como produzem enzimas?	14
2.1.3. O gênero <i>Aspergillus</i>	16
2.2. Fermentação em Estado sólido	24
2.3. Fermentação Submersa	25
2.4. Lacase: enzima oxidativa	27
2.4.1. Condições que influenciam na produção de lacases	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Microrganismos e condições de cultivos	31
3.2. Seleção do meio sólido para esporulação	31
3.3. Metodo Qualitativo	32
3.4. Fermentação em estado sólido (FES)	32
3.5. Fermentação Submersa (FS)	32
3.6. Determinação da concentração de proteínas totais	33
3.7. Determinação da atividade de lacase	33
3.8. Cálculo da atividade de lacase	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1. Microrganismos e condições de cultivo	34
4.2. Teste Qualitativo	35
4.3. Produção e determinação de lacase oriunda da FES	36
4.4. Produção e determinação de lacase oriunda da FS	41
4.5. Determinação da concentração de proteínas totais	44
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	46
7. APÊNDICES	56
8. ANEXOS	58

RESUMO

As lacases são enzimas ligninolíticas que contêm cobre, sendo conhecidas por serem ótimos agentes oxidantes na presença de oxigênio. Dentre as enzimas ligninolíticas, as lacases são o grupo mais amplamente estudado, sendo conhecidas como catalisadores verdes, pois promovem a redução direta do oxigênio molecular à água sem a formação de subprodutos indesejados. Atualmente as lacases são secretadas principalmente por fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota e possuem uma diversidade de aplicações industriais que incluem a descoloração e degradação de corantes e efluentes têxteis, detergentes para alvejamentos de tecidos, branqueadores dentais para higiene oral, branqueamento de celulose na indústria de tecidos e de papel e na desconstrução da biomassa lignocelulósica. Sendo assim, o presente estudo objetivou a produção de lacases pela fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS) do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18, um microrganismo isolado do solo da Caatinga, utilizando como substratos os resíduos agroindustriais, farelo de trigo, farinha de soja, casca de macaxeira e de laranja. O teste qualitativo realizado pela adição de 3 Mm do substrato ABTS ao meio BDA foi positivo para produção extracelular de lacase, sendo confirmado pela formação de um halo na coloração verde medindo cerca de 34 mm. O substrato da casca de laranja utilizado na FES inibiu o crescimento fúngico até o tempo de 96h de fermentação, e conseqüentemente não houve produção enzimática com este substrato. A atividade de lacase foi determinada usando ABTS como substrato, assim, a maior atividade enzimática foi de 305,56 U/mL obtida após 48h de FES a 30°C no substrato de farelo de trigo, a segunda maior produção de lacase foi de 296,29 U/mL também oriunda da FES, porém no substrato da casca de macaxeira e com tempo de 72h de fermentação. Para a FS foi utilizado o meio MS-2 modificado pelo uso do ABTS como indutor e também pela solução nutritiva contendo diversos íons metálicos, os substratos usados foram o farelo de trigo e a farinha de soja no tempo de fermentação de 48h sendo a maior atividade de lacase na FS obtida com o meio MS-2 modificado pela solução nutritiva e pela adição de ABTS, sendo de 0,1944 U/mL tendo o farelo de trigo como substrato. Portanto, a recente linhagem fúngica *A. serratalhadensis* é produtora de lacase e tem desempenho ideal na fermentação em estado sólido, sobretudo quando utilizado como substrato o resíduo agroindustrial de farelo de trigo, demonstrando o seu potencial para indústria biotecnológica.

Palavras chaves: Enzima ligninolítica; Fungo; Fermentação.

ABSTRACT

Laccases are copper-containing ligninolytic enzymes and are known to be excellent oxidizing agents in the presence of oxygen. Among the ligninolytic enzymes, laccases are the most widely studied group, being known as green catalysts, as they promote the direct reduction of molecular oxygen to water without the formation of unwanted by-products. Currently, laccases are secreted mainly by fungi of the phyla Ascomycota and Basidiomycota and have a variety of industrial applications that include the discoloration and degradation of dyes and textile effluents, detergents for fabric bleaching, tooth whiteners for oral hygiene, pulp bleaching in the textile industry. fabrics and paper and in the deconstruction of lignocellulosic biomass. Therefore, the present study aimed at the production of laccases by solid state (FES) and submerged (FS) fermentation of *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18, a microorganism isolated from the Caatinga soil, using as substrates agro-industrial residues, wheat bran, soy flour, manioc and orange peel. The qualitative test performed by adding 3 Mm of ABTS substrate to PDA medium was positive for extracellular laccase production, confirmed by the formation of a green halo measuring about 34 mm. The orange peel substrate used in FES inhibited fungal growth up to 96 h of fermentation, and consequently there was no enzymatic production with this substrate. Laccase activity was determined using ABTS as substrate, so the highest enzyme activity was 305.56 U/mL obtained after 48h of FES at 30°C in wheat bran substrate, the second highest laccase production was 296 .29 U/mL also from FES, but in the manioc peel substrate and with a fermentation time of 72 hours. For the FS, the MS-2 medium modified by the use of ABTS as an inducer and also by the nutrient solution containing several metal ions was used, the substrates used were wheat bran and soybean flour in the fermentation time of 48 hours, being the highest activity of laccase in the FS obtained with the MS-2 medium modified by the nutrient solution and the addition of ABTS, being 0.1944 U/mL with wheat bran as substrate. Therefore, the recent fungal strain *A. serratalhadensis* is a laccase producer and has an ideal performance in solid-state fermentation, especially when the agro-industrial residue of wheat bran is used as a substrate, demonstrating its potential for the biotechnology industry.

Keywords: Ligninolytic enzyme; Fungus; Fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas ligninolíticas são responsáveis por catalisar as reações de compostos lignocelulósicos, ou seja, realizam a decomposição completa de um material lignocelulósico, e as enzimas que atuam nesse processo são: lignina peroxidases, manganês peroxidases, lacases e aril-álcool oxidases (ERGUN e UREK., 2017). Dentre essas, as lacases são o grupo de enzimas mais amplamente estudado, pois catalisam a oxidação de compostos fenólicos usando oxigênio molecular como aceitador de elétrons (MEHANDIA *et al.*, 2020).

As lacases (EC 1.10.3.2, *p*-difenoil: dioxigênio oxidorreductase) são oxidases multicobre, cuja produção pode ser otimizada com o uso de mediadores, ou ainda utilizando substratos que beneficiam a sua produção, assim as lacases podem incluir a catálise de compostos não-fenólicos (DEBNATH e SAHA, 2020; YUAN *et al.*, 2020). A produção de lacase deu-se inicialmente por plantas, em seguida foi descoberta a produção por microrganismos, e atualmente estudos apontam que essa enzima é secretada principalmente por fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, pois em geral esses fungos filamentosos são capazes de produzir extracelularmente uma grande diversidade de enzimas no ambiente, em virtude do seu alto poder degradativo e biosortivo (WANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

As lacases de origem fúngica além de resistirem a condições ambientais adversas, apresentam alta estabilidade molecular e maior potencial de oxidação do que as lacases de outros organismos (RODGERS *et al.*, 2010). Também apresentam baixa especificidade a substratos, sendo este um fator positivo, pois permite a ampliação na capacidade de aplicação da enzima, logo é comum a utilização de diversos tipos de subprodutos agroindustriais, como cascas de frutas, farinha de soja, farelo de trigo, borra de café, folhas de chá usadas, monômeros de lignina e resíduos lignocelulósicos para sua produção, assim estes substratos vêm sendo utilizados tanto na fermentação submersa quanto na fermentação em estado sólido. (SHARMA *et al.*, 2017).

As lacases têm atraído atenção mundial com amplas aplicações industriais (AGRAWAL, CHATURVEDI e VERMA, 2018), pois devido às suas propriedades catalíticas de oxidação observam-se aplicações versáteis em diferentes campos industriais, incluindo alimentício, cosméticos, têxteis, papel e celulose. Assim, há relatos na literatura do seu uso na remediação de diversos tipos de poluentes ambientais, sobretudo na degradação

e descoloração de corantes e efluentes de indústrias têxteis e sucroalcooleiras no solo, na deslignificação de compostos celulósicos, no branqueamento de tecidos e na produção de biocombustíveis (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; DEBNATH e SAHA, 2020; DESKA e KOŃCZAK, 2019; JUNIOR *et al.*, 2019, SANÉ *et al.*, 2014).

Ao utilizar um pré-tratamento com enzimas de lacase para otimizar a produção de nanofibrilas de lignina-celulose DIAS *et al.* (2022) relataram que lacase utilizada foi eficiente em modificar a lignina para facilitar a ação da endoglucanase sobre a celulose e que o pré-tratamento melhorou a qualidade e ainda proporcionou uma economia de energia de 42%. BAGEWADI, MULLA e NINNEKAR (2017) obtiveram sucesso ao utilizar um sistema mediador de lacase, produzida pela FES do *Trichoderma harzianum* estirpe HZN10, aplicado na deslignificação do pó de serra, assim os autores afirmaram que a lacase pode ser uma ferramenta poderosa na conversão de biomassa para biocombustível.

Por conseguinte, atualmente o Brasil importa enzimas celulolíticas, empregadas na desconstrução de biomassa lignocelulósica, sendo a maior parte dessas enzimas obtida a partir de microrganismos da biodiversidade brasileira (União Nacional da Bioenergia, 2020). O mercado global de enzimas em 2017 foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024, também em 2017 estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos. (PAPADAKI *et al.*, 2020).

Portanto, o presente estudo teve por objetivo explorar o potencial do fungo filamentosso *Aspergillus serratalhadensis* para produção de lacases. Esse microrganismo foi isolado em 2018, do solo da Caatinga, região do Nordeste brasileiro, sendo uma espécie recém descoberta, sem registros de estudos sobre o seu potencial na produção de compostos bioativos, logo esse estudo é inédito.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fungos: Quem são e como produzem enzimas?

Os fungos são organismos eucarióticos, unicelulares ou pluricelulares, pertencentes ao Reino Fungi, que é um dos ramos mais diversos e antigos da árvore da vida. E inclui cerca de 2 a 5 milhões de espécies que desempenham papéis vitais nos ecossistemas terrestres e aquáticos. É difícil generalizar características dos fungos, pois eles exibem

grande variedade de estilos de vida, alimentares, morfologias, fisiologias, padrões de desenvolvimento e ecologias (HEITMAN *et al.*, 2020).

Existem mais de 200 ordens de fungos classificadas em 12 filos, os quais são colocados em seis grandes grupos: os subreinos Dikarya (que inclui os filos Ascomycota, Basidiomycota e Entorrhizomycota) e Chytridiomycota (que inclui os filos Chytridiomycota, Monoblepharidomycota e Neocallimastigomycota); os filos Mucoromycota, Zoopagomycota e Blastocladiomycota; e o grupo Opisthosporidia (que inclui os filos Aphelidiomycota, Cryptomycota/Rozellomycota e Microspirdia (JAMES *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021).

Acredita-se que há milhares de espécies fúngicas não identificadas, pois fatores como dificuldade de isolamento e incapacidade de aplicar métodos moleculares podem contribuir para um menor número de espécies em certos grupos. Porém, não há dúvidas de que os ascomicetos e basidiomicetos compreendem a grande maioria da diversidade fúngica (BLACKWELL, 2011). Há ainda, uma classificação mais básica em que os fungos são divididos em três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados fungos microscópicos, nos quais as leveduras são unicelulares e os filamentosos são pluricelulares, sendo os cogumelos fungos macroscópicos (ABREU, RODOVIDA e PAMPHILE, 2015).

Vale salientar que um mecanismo bastante comum entre os fungos é o dimorfismo, ou seja, a capacidade de alternar entre uma forma leveduriforme e uma forma filamentosa que geralmente ocorre em virtude de alterações nas condições de temperatura e/ou nutrientes, assim o microrganismo altera o seu crescimento e morfologia. Este fenômeno também está relacionado com a virulência (MARTÍNEZ e MARTÍN, 2001), como por exemplo o ascomicota *Penicillium marneffii*, que é capaz de se converter da forma não patogênica do solo (hifas) para a patogênica leveduriforme nos pulmões de humanos ou de outros hospedeiros (SANTOS *et al.*, 2012)

Os fungos são microrganismos de grande importância biotecnológica. Os cogumelos são conhecidos por suas propriedades nutracêuticas ou medicinais, como efeitos antivirais, antibacterianos, anti-parasitários, antitumorais, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e moduladores do sistema imune (PHILIPPOUSSIS, 2009). Já as leveduras são os fungos microscópicos mais utilizados em indústrias devido a fermentação alcoólica, sendo responsáveis pela fabricação de bebidas alcoólicas e de pães, cuja *Saccharomyces cerevisiae* é a que mais se destaca, devido à importância econômica dos processos alimentícios (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os fungos filamentosos representam uma variabilidade diversificada de microrganismos distribuídos em macro e micro-habitats. Devido a essa característica, eles possuem diversidade metabólica e bioquímica, sendo de grande importância biotecnológica. Além disso, desempenham um papel significativo no estilo de vida humano e no ambiente, pela participação na produção de alimentos, nos produtos para saúde e na reciclagem de compostos da biosfera. Eles também são os mais atrativos dentre os microrganismos devido à sua excelente capacidade de produção de enzimas multiextracelulares. Portanto, são usados em muitos processos industriais como na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídios e glicolipídios, sendo potencialmente valiosos (LOPES, 2011; MAHAPATRA e BANERJEE, 2013; ZHAO, DENG e FAG, 2018).

Assim, diversas substâncias de interesse biotecnológico com benefícios para a saúde humana, animal e equilíbrio ambiental são produzidas como metabólitos primários e secundários de fungos. Dentre os fungos filamentosos destacam-se o gênero *Monascus*, por serem promissoras fontes de corantes naturais redutores do colesterol, o *Fusarium* e o *Neurospora* que têm sido fontes de importantes produtos na indústria alimentícia, juntamente com o gênero *Aspergillus*, que é um dos mais estudados em escala industrial sendo utilizado para a produção de proteínas comercializadas com alto valor agregado (ABREU, RODOVIDA e PAMPFILE, 2015; FERREIRA *et al.*, 2016).

2.1.2 O Gênero *Aspergillus*

Aspergillus é o gênero mais comum entre os fungos filamentosos, possui mais de 250 espécies, pertencentes à família Trichocomaceae, a ordem Eurotiales, a classe Eurotiomycetes e ao filo Ascomycota, dentro do subreino Dikarya. São características dos fungos pertencentes a este filo, micélio septado ou células de leveduras e esporo sexuado do tipo ascóporo formado no interior de ascos. (GUARRO, 2012, HEITMAN, 2011). O nome *Aspergillus* foi dado devido a sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um *aspergillum* (aspersório – um borrifador de água benta) (GIBBONS e ROKAS, 2013).

A estrutura “aspergillum” ou “cabeça aspergillar”, consiste de uma haste asseptada que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem as estruturas reprodutivas, denominadas células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides (células alongadas) responsáveis por formar os conídios, produzem conídios com diferentes pigmentações e

ornamentações. Sendo assim, um *aspergillum* uniseriado é formado por uma vesícula total ou parcialmente coberta por fiálides, enquanto um *aspergillum* bisseriado apresenta antes das fiálides uma camada de células chamadas de métulas (células que dão origem as fiálides). Essas estruturas morfológicas são características importantes para a classificação do gênero *Aspergillus* (SANTOS, 2007; SILVA, 2014).

As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial, estando presentes no solo, no ar, na água e nas superfícies de vegetais e animais, frequentemente estão associados a decomposição da matéria orgânica, existem espécies de *Aspergillus* que são patogênicas de homens e animais e há outras que liberam toxinas. Entretanto, membros do gênero *Aspergillus* são extensivamente estudados devido sua capacidade de sintetizar compostos de alto valor agregado e enzimas de interesse industrial. Logo, muitas espécies são utilizadas para obtenção de enzimas na biossíntese química e na transformação de compostos, alguns exemplos podem ser observados na tabela 1 (DADHEECH *et al.*, 2019; ROSA, CAMPOS e BARONI, 2002; ROCHA, 2010).

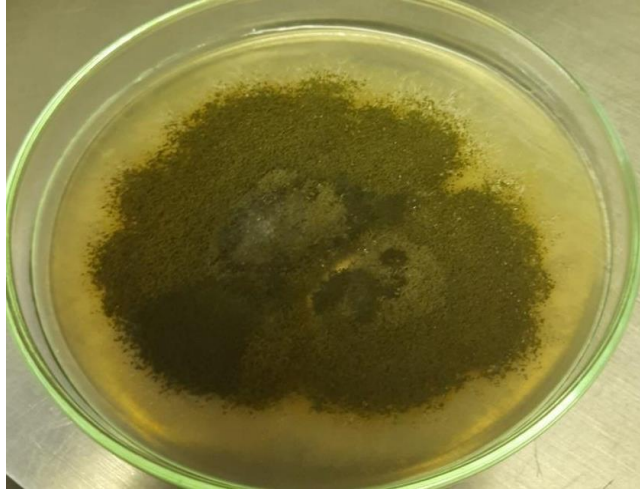
As colônias de *Aspergillus* geralmente tem crescimento rápido e exuberante, e apresentam uma ampla variação na coloração. Inicialmente são brancas, amarelas, passando para verde, marrom ou preto, com as mais diversas texturas, rugosas, granular e algodonosas, como pode ser observado nas figuras de 1 a 4. Além disso, são compostas por micélios aéreos, com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios (HUBKA, 2013; SANTOS, 2007).

Figura 1- Colônia do *Aspergillus* URM 4456 em meio BDA.



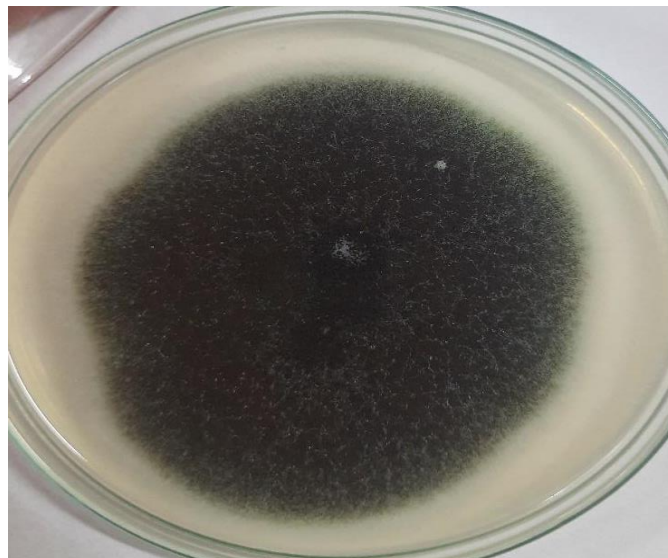
Fonte: Autor (2022).

Figura 2- Colônia do *Aspergillus* sp. em meio BDA.



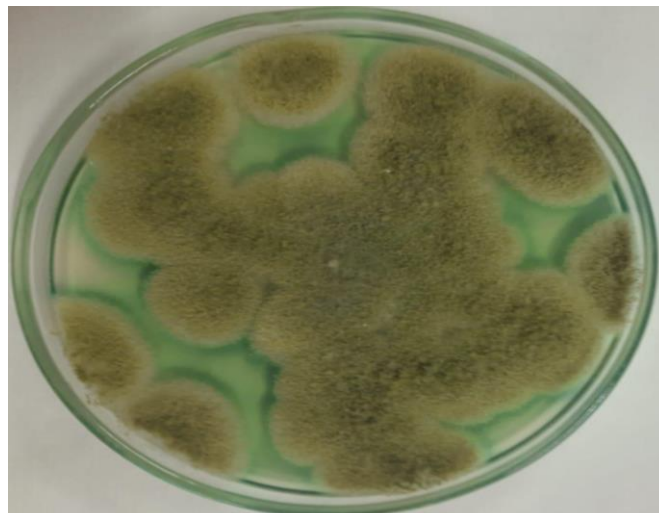
Fonte: Autor (2022).

Figura 3 - Colônia do *Aspergillus* sp. em meio BDA.



Fonte: Autor (2022).

Figura 4 - Colônia do *Aspergillus flavus* UCP 0316 em meio BDA contendo 3 Mm de ABTS.

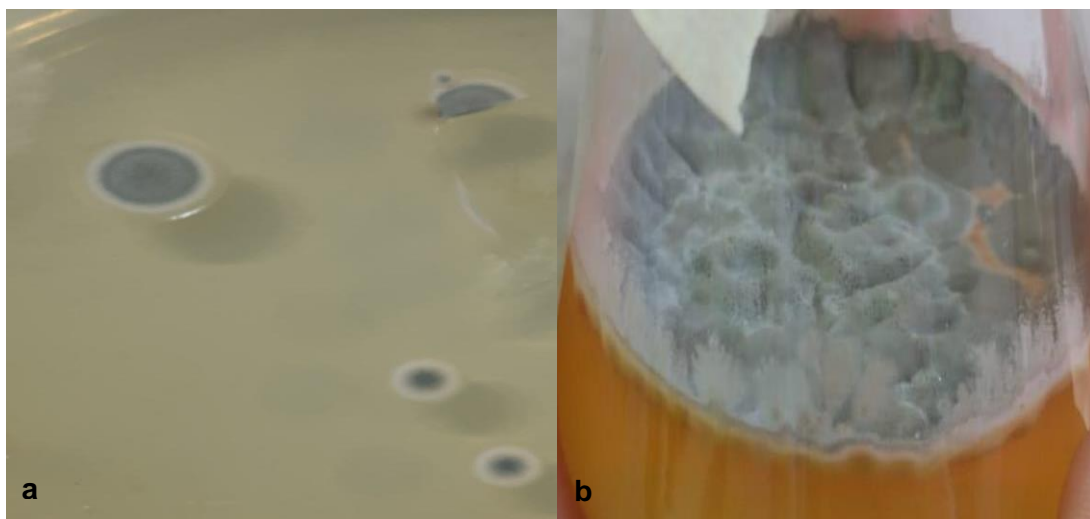


Fonte: Autor (2022).

O *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 foi isolado no ano de 2018 do município de Serra Talhada, região pertencente ao bioma da Caatinga, Nordeste Brasileiro, e por ser uma espécie recente não há publicações relacionando o potencial desta linhagem com a produção de compostos bioativos, sendo este estudo inédito (NCBI:txid2283851). A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e ocupa 10% do território nacional e mesmo localizada numa área de clima semiárido tem grande importância para a Região Nordeste por apresentar peculiaridades marcantes em termos de pluviometria, fertilidade do solo e biodiversidade da microbiota (MESQUITA, PINTO e MOREIRA, 2017). Assim, há diversos microrganismos neste bioma com propriedades inovadoras, que por serem isolados do solo com características particulares oportunizam novas descobertas acerca do potencial de utilização de novos compostos bioativos com interesse industrial (MONCIARDINI *et al.*, 2014).

As colônias do *A. serratalhadensis* URM 79/18 têm coloração inicialmente branca e posteriormente cinza, como pode ser observado na figura 5. Com 72 horas de inóculo em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) utilizando a técnica de microcultivo e o corante azul de Amann utilizando a microscopia óptica foi possível visualizar as hifas vegetativas que colonizaram todo o meio de cultura, (figura 6). Constatou-se também que suas hifas são hialinas e cenocíticas, ou seja, asseptadas, além de conter bastante material de reserva em seu citoplasma (figura 7 e 8). Apesar de não ter sido possível observar os conidióforos contendo os esporos, verificou-se que não possuem septos nem mesmo no corpo de frutificação, e que seus esporos possuem tamanho pequeno quando comparados com outras espécies de *Aspergillus* (figura 7 e 8).

Figura 5 – Colônia do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 em meio BDA.



a= após 48h de inóculo e b= após 7 dias de inóculo.

Fonte: Autor (2022).

Figura 6 - Micélios vegetativos do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 colonizando o meio de cultura, imagem obtida em microscopia óptica com lente de aumento de 10x



Fonte: autor (2022).

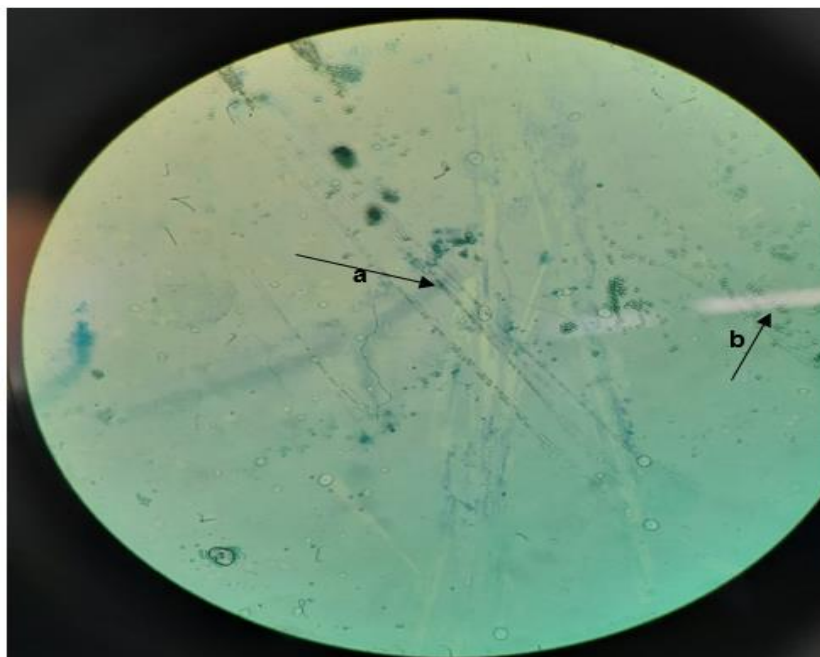
Figura 7 - Hifas hialinas e cenocíticas do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 e corpos de frutificação, imagem obtida em microscopia óptica com lente de aumento de 40x.



a = Hifas hialinas; b = esporos

Fonte: Autor (2022).

Figura 8 - Hifas do *A. serratalhadensis* URM 79/18 com bastante substância de reserva em seu citoplasma e esporos em cadeia, imagem obtida em microscopia óptica com lente de aumento de 40x.



a= substância de reserva/ b= esporos em cadeia

Fonte: Autor (2022).

Por serem heterotróficos os fungos obtêm sua alimentação a partir de matéria orgânica, assim necessitam de substratos orgânicos para obtenção de carbono e energia para o seu metabolismo (ABREU, RODOVIDA e PAMPHILE, 2015). Os resíduos agroindustriais, em geral, incluem os subprodutos gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou animais, em que normalmente por não haver aplicação direta desses resíduos pouco ou nenhum valor econômico são atribuídos a eles (PANESAR *et al.*, 2016). Logo, os resíduos agrícolas são os biorrecursos renováveis mais abundantes em nossa terra, pois são enriquecidos com uma boa quantidade de polissacarídeos como celulose, hemicelulose, pectina e amido (MONDAL *et al.*, 2020).

De acordo com a FAO (2019), devido a origem vegetal, cerca de 21,6% das frutas e hortaliças são perdidas em diferentes etapas da cadeia produtiva agrícola. O Brasil, por apresentar uma economia fortemente ligada à agricultura, produz grandes quantidades de resíduos da agroindústria e uma atenção especial vem sendo dada para o reaproveitamento desses subprodutos (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010). Portanto, o uso de matéria-prima de baixo custo para a produção de enzimas é uma solução ambientalmente sustentável e econômica (VALLADARES-DIESTRA, VANDENBERGHE e SOCCO, 2021).

Dentre os resíduos agroindustriais mais utilizados como substratos para a produção de metabólitos oriundos de fungos, como bem pode ser constatado na tabela 1, o farelo de trigo é o mais utilizado (SANTOS *et al.*, 2018), também há vários relatos na literatura do uso de farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de milho, bagaço ou casca de laranja, uva e outras frutas (DAMARE *et al.*, 2020; DÍAZ *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2011; RAZALI, RASIT e OOI, 2021). Assim, dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Principais enzimas produzidas por *Aspergillus spp.*

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Enzimas	Tipo de Fermentação	Substratos	Autores
<i>A. japonicus</i>	Poligalacturonase	FES	Casca de maracujá	GUIMARÃES <i>et al.</i> , (2022)
<i>A. oryzae</i>	Alfa-amilase	FES	Casca e farinha de soja	MELNICHUK <i>et al.</i> , (2020)
<i>A. niger e A. Oryzae</i>	Celulase, tanase e pectinase	FES	Bagaço de uva	MEINI <i>et al.</i> , (2021)
<i>A. brasiliensis</i>	Inulinase e Invertase	FES/ FS	Perlita/ Sacarose	GUERRERO-URRUTIA <i>et al.</i> , (2021)
<i>A. flavus</i>	Pululanase	FES	Farelo de trigo	NAIK <i>et al.</i> , (2022)
<i>A. fumigatus</i>	Celulase, amilase, xilanase, pectinase e β -glicosidase	FES	Bagaço de cana-de-açúcar; Farelo de trigo e casca de laranja	MONDAL <i>et al.</i> , (2020)
<i>A. niger</i>	Lipase	FES	Resíduos agroindustriais	KHOOTAMA <i>et al.</i> , (2018)
<i>A. niger</i>	Xilanase	FES	Casca de arroz	RAZALI, RASIT e OOI, (2021)
<i>A. allahabadii</i>	Lignocelulolíticas	FS	Palha de arroz	SHARMA <i>et al.</i> , (2022)
<i>A. flavus</i>	Protease	FES	Farelo de trigo; Farelo de arroz; torta de amendoim; soja e bagaço de cana	DAMARE <i>et al.</i> , (2020)
<i>A. fumigatus</i>	Lignocelulolíticas	FS	Sementes de jatobá e Tamarindo	CONTATO <i>et al.</i> , (2021)
<i>A. niger</i>	Proteases e Xilanase	FS	Bagaço de cana-de-açúcar e Farelo de soja	VALLADARES-DIESTRA, VANDENBERGHE e SOCCO (2021)
<i>A. tamarii</i>	Protease, colagenase, endoglucanase, pectinases e frutossiltransferase	FES	Farelo de Trigo	SANTOS <i>et al.</i> , (2020)
<i>A. niveus</i>	Quitinases	FES/FS	Cascas de camarão	ORNELA, (2022)
<i>A.tubingensis</i>	Celulase e Xilanase	FES/ FS	Cachos de frutos vazios	INTASIT <i>et al.</i> , (2021)

FES = Fermentação em estado sólido/ FS= Fermentação submersa.

Fonte: Autor (2022).

2.2 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido é uma técnica da biotecnologia com grande potencial para recuperação de compostos bioativos presentes em resíduos agroindustriais, ela consiste no crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (SADH, DUHAN e DUHAN, 2018). Assim, fungos, leveduras e bactérias têm sido usados para a extração de biocompostos, devido à capacidade desses microrganismos em produzir enzimas que degradam a parede celular das plantas, possibilitando a mobilização dos compostos em direção ao solvente de extração (LIZARDI-JIMÉNEZ e HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017).

Essa técnica tem se mostrado vantajosa, pois além de simular o habitat natural de fungos de ambientes adversos, apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de pH e temperatura (HANSEN *et al.*, 2015). A FES pode ser considerada uma técnica ambientalmente correta, pois utiliza matérias-primas de baixo custo, subutilizadas ou rejeitadas pela indústria agrícola, durante o processo de produção, como soja, trigo, milho e cana-de-açúcar (MANFREDINI, 2020).

Além disso, a FES tem várias vantagens sobre FS, pois é uma técnica simples, de menor investimento de capital e necessidade de energia, menor liberação de efluentes, maior produtividade e recuperação do produto (GUPTA *et al.*, 2018). Segundo Sadh *et al.* (2018) estudos mostram que baixas quantidades ou ausências de água na FES oferece algumas vantagens, como por exemplo a fácil recuperação dos compostos biativos, baixos custos operacionais, facilidade de implantação, além de reaproveitar os resíduos agroindustriais que reduzem os custos de produção, logo altas atividades biológicas são alcançadas nos extratos finais que garantem a lucratividade do processo (TORRES- LEÓN *et al.*, 2019).

A FES foi inicialmente desenvolvida para o manejo de resíduos sólidos agroindustriais complexos e foi proposta principalmente como alternativa para lidar com os problemas relacionados à manutenção da bioatividade por longa vida de prateleira (KUMAR *et al.*, 2021), o que permitiu a aplicação da fermentação em estado sólido na produção de produtos farmacêuticos, alimentos e outros produtos agrícolas, como pesticidas e reguladores de crescimento de plantas. De acordo com León-torres *et al.* (2019) a FES do *Aspergillus niger* utilizando como substrato a semente de manga

mobilizou compostos polifênicos e melhorou as propriedades nutracêuticas, sendo uma fonte promissora de antioxidantes naturais.

Entretanto, diversos fatores podem influenciar a FES, estes incluem a seleção do microrganismo adequado, substrato, umidade, atividade de água, temperatura, oxigênio, pH e concentração de nutrientes, essas condições afetam significativamente o crescimento celular e a formação do produto. Porém, há uma dificuldade em monitorar e controlar os diferentes parâmetros envolvidos nesse processo, principalmente o pH, temperatura, aeração, oxigenação e umidade. Além disso, o produto final da FES possui mais impurezas que os oriundos da FS, conseqüentemente acarretando em custos mais elevados para a purificação e recuperação dos metabólitos desejados (BEHERA e RAY, 2016; COSTA *et al.*, 2018; SINGHANIA *et al.*, 2009).

A água tem uma relação crítica com a FES e por isso é bastante avaliada, e tem sido atribuída como um parâmetro fundamental para a transferência de massa de água e de solutos através das células microbianas. O controle deste parâmetro pode ser utilizado para modificar a produção metabólica ou excreção de bioproduto de um microrganismo (SILVA, 2014). Durante a FES uma grande quantidade de calor metabólico é produzido e está diretamente relacionado com as atividades metabólicas do microrganismo e da quantidade do substrato. A geração de calor advinda das atividades metabólicas dos microrganismos não é desejada e deve ser dissipada, pois afeta a germinação de esporos, o crescimento, a formação de produto e esporulação, além de desnaturar as enzimas produzidas durante o processo (CASCIATORI *et al.*, 2016).

Outro fator importante para a FES é o pH, pois o crescimento microbiano é significativamente afetado pelo pH da fermentação, assim as soluções nutritivas podem ser adicionadas para diminuir a faixa de variação e não prejudicar o crescimento celular e a produção de biomoléculas. Entretanto, o controle de pH, durante a FES, é difícil de ser realizado (SILVA, 2014). KHAN *et al.* (2020) em seu estudo utilizou a FES do *A. flavus* com um substrato de planta e fazendo testes para verificar a melhor temperatura e pH de produção para a enzima lacase constatou que a melhor temperatura de produção em FES entre as testadas de 10-40°C foi a de 35°C e o pH ótimo foi 5,5. No entanto, esses fatores variam de organismo para organismo.

2.3 Fermentação submersa

Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, em que as fontes de nutrientes

utilizadas são solúveis e o desenvolvimento do microrganismo se dá na presença de água. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95%. A FS é a técnica majoritariamente usada para a produção de enzimas industriais devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009; RODRIGUES e SANTANA, 2001).

Neste tipo de fermentação, além de um melhor controle do processo, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células. O sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria, podendo ainda ser realizado por densidade ótica no caso de cultivos com bactérias (LIMA *et al.*, 2003). Assim, a FS possui um tremendo potencial para a produção de enzimas por fungos filamentosos, pois permite um sistema de cultivo homogêneo e seu produto bruto fermentado pode ser utilizado diretamente como coquetéis enzimáticos para indústrias (RAMAMOORTHY, SAMBAVI e SAHADEVAN, 2019).

Na FS, fatores como temperatura, agitação, pH, aeração e outros de suma importância para o rendimento da biomolécula ou produto de interesse podem ser amplamente controlados, por meio da tecnologia em reatores específicos (VAIDYANATHAN *et al.*, 1999). Logo, na FS os parâmetros do processo podem ser controlados em maior grau em comparação a FES, especialmente a temperatura, um dos fatores mais importantes, pois afeta a taxa de crescimento, a tensão de oxigênio dissolvido, a taxa de evaporação do meio, a formação de *pellets* e a formação do produto (HANSEN *et al.*, 2015).

A maioria dos fungos filamentosos tende a produzir *pellets* esféricos quando cultivados em uma cultura submersa, acredita-se que a morfologia ideal para o crescimento e a produção de enzimas seja quando as pontas das hifas são maximizadas, na FS isso é alcançado com pelotas menores ou micélios dispersos. A capacidade de controlar a morfologia de um fungo em cultura submersa é importante para manter o rendimento do produto alto e a morfologia fúngica em culturas submersas (PAPAGIANNI, 2004).

De acordo com EL-ENSHASY (2007) se altas taxas de agitação forem usadas, a morfologia será predominantemente de hifas danificadas e menos aglomerados, enquanto que em agitação mais baixa, a formação de *pellets* de tamanho variável será

predominante. Assim, França e Silva (2021) utilizaram a fermentação submersa do *Aspergillus niger* no substrato de casca de batata inglesa e de macaxeira em 150 rpm, 37°C durante 144 horas e constataram a produção da enzima amilase, sendo o melhor resultado obtido com o resíduo de casca de batata inglesa.

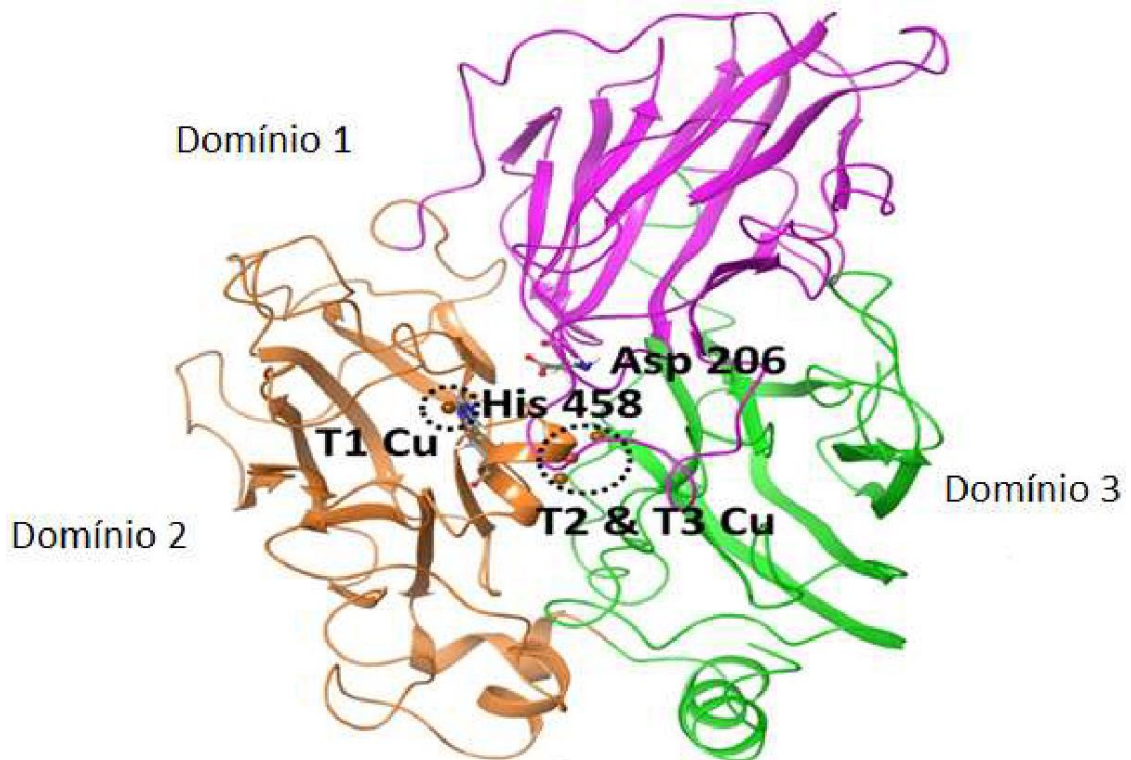
Entretanto, as características morfológicas alteram-se entre as diferentes espécies. Outros fatores que afetam a morfologia dos microrganismos e que influenciam diretamente na produção enzimática são as características de transferência de massa, valor de pH e micropartículas sólidas no meio (HANSEN *et al.*, 2015). Logo, estes fatores são determinantes para a produção de metabólitos primários e secundários, como as diversas classes de enzimas com potencial biotecnológico para aplicação industrial, visto que a fabricação de enzimas é uma área crescente da biotecnologia e os números anuais de vendas mundiais de enzimas estão perto de bilhões de dólares (HASAN; SHAH e HAMEED, 2006).

2.4 Lacase: Uma enzima oxidativa

As lacases (EC1.10.3.2., para-bezenediol:dioxigênio oxidorreduases, p-difenol oxidase) são oxidases multi-cobre azuis contendo quatro átomos de cobre por monômero, elas desempenham várias funções em diferentes organismos, em plantas, estão envolvidas na reparação das partes danificadas, além da síntese de lignina, enquanto em insetos, elas têm um papel na esclerotização da cutícula, ou seja, no exoesqueleto de quitina, já as lacases de fontes microbianas estão principalmente ligadas a biorremediação, desintoxicação e degradação da lignina (GAVNHOLT e LARSEN, 2002, ZHANG *et al.*, 2020).

A maioria das lacases conhecidas, contém quatro íons de cobre de três tipos, sendo estes T1, T2 e T3, identificados com base em suas propriedades espectroscópicas, como pode ser observado na figura 9. É por meio desses sítios ativos de cobre que as lacases catalisam a oxidação de uma ampla gama de substratos na presença de oxigênio molecular, sem qualquer cofator adicional, e liberando água como subproduto, fato este que as tornam excepcionais entre o grupo das oxidases multi-cobre (ZOFAIR *et al.*, 2022). As lacases fúngicas são principalmente glicoproteínas extracelulares com peso molecular entre 60 e 80 kDa (LUNDELL *et al.*, 2010).

Figura 9 - Sítios ativos de cobre em uma lacase fúngica.



Fonte: Adaptado de Mehra *et al.* (2018).

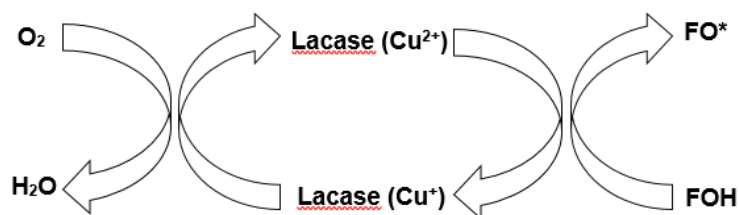
Dessa forma, as lacases estimulam a degradação de vários contaminantes orgânicos, aminas alifáticas, compostos aromáticos e fenólicos por meio de sua oxidação e redução concomitante do oxigênio molecular para água, sem a formação de subprodutos indesejáveis, como por exemplo o peróxido de hidrogênio que é formado como subproduto da manganês peroxidase, como pode ser observado nas figuras 10 e 11. As lacases atuam pela abstração de 1 elétron de fenóis, em função da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O . (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

Sendo assim, como um processo “verde” a catálise enzimática das lacases fornecem processamentos eficientes dos substratos, baixo consumo de energia e sensibilidade ecológica. As reações catalisadas pela lacase são ecologicamente corretas, não envolvem a geração de outros subprodutos tóxicos e o único produto secundário é a água. Logo, estas enzimas também são conhecidas como “catalisadores verdes” (OTHMAN, SANROMÁN, MOLDES, 2021).

A atividade de lacase pode ser determinada por espectrofotometria, pelo monitoramento da coloração dos produtos de oxidação (HOFER e SCHLOSSER, 1999; ZOFAIR *et al.*, 2022), sendo utilizado os seguintes substratos, guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou ainda o substrato não fenólico, o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato) (ABTS), que diferentemente dos substratos fenólicos, a oxidação do ABTS

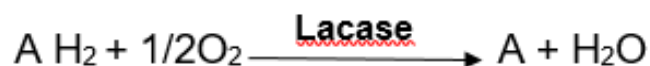
independe do pH e resulta na formação de um radical catiônico com coloração (ABTS•+), de alta estabilidade em solução, logo o ABTS é o substrato mais utilizado para determinação da atividade de lacase (HOFER e SCHLOSSER, 1999, JOHANNES e MAJCHERCZYK, 2000).

Figura 10 - Esquema do ciclo catalítico das lacases; FOH = substrato fenólico.



Fonte: Adaptado de Aguiar e Ferraz (2011).

Figura 11 - Esquema reação da lacase, reduzindo o oxigênio molecular a água.



Fonte: Autor (2022).

2.5 Condições que influenciam a produção de Lacases

As lacases são proteínas multi-cobre e geralmente são codificadas por uma família de genes, cuja expressão pode ocorrer de forma constitutiva, normal ao metabolismo, ou indutiva, acentuada quando em condições apropriadas (KLONOWSKA *et al.*, 2002). Usualmente a enzima origina-se no citoplasma e a ação sobre a lignina depende de sua secreção. Assim, as condições favoráveis para a secreção enzimática variam bastante dependendo das linhagens microbiológicas utilizadas (MAYER e STAPLES 2002).

Além da linhagem microbiana, diversos fatores influenciam a produção de lacases e conseqüentemente a formação de produtos, os quais destacam-se a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração, além disso é de suma importância saber se a cepa fúngica tem um desempenho ideal em fermentação submersa ou sólida (IKEHATA, BUCHANAN e SMITH, 2004).

Segundo Baptista *et al.* (2012) a utilização de glicose como co-substrato nutricional

junto com fontes de carbono mais complexas podem potencializar a produção de algumas enzimas, sendo assim em seu estudo os autores usaram o meio de cultivo *sabouraud*, glicose como controle e óleo diesel como indutor e a atividade enzimática de lacase variou de 4.350U/L a 4.620U/L, com a mais alta produção obtida pelos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.

GALHAUP *et al.* (2002) relatou que em estudos com diversas fontes de carbono para produção de lacases foi observado que as diferentes fontes utilizadas foram eficientes, resultando em altos níveis de atividade da enzima, principalmente com o uso de glicose ou celobiose (60 – 65 U/mL). Entretanto, quando foi usado o glicerol que tem um consumo mais baixo que a glicose, os níveis da enzima foram semelhantes, porém foi necessário um período mais longo de cultivo. Além disso, ao estudar os efeitos das fontes de nitrogênio na síntese de lacases por *T. pubescens*, os autores constataram que a maior produção da enzima (310 U/mL) foi obtida utilizando a peptona (80mM) como única fonte de nitrogênio, e ao substituí-la por extrato de levedura constatou-se um decréscimo na produção da enzima (± 100 U/mL).

Dessa forma, a produção de lacases possui uma relação de dependência das fontes de carbono e nitrogênio (GALHAUP *et al.*, 2002). Assim, é comum a otimização da produção dessa enzima utilizando diferentes concentrações de componentes do meio de cultivo, de fermentação e de íons e surfactantes como indutores. No entanto, observa-se que diferente da maioria das outras enzimas, a lacase fúngica é bastante genérica quanto ao substrato de ação, podendo catalisar a oxidação de um amplo espectro de substâncias fenólicas e não fenólicas (VISWANATH *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2015).

Velásquez-Quintero, Merino-Restrepo e Hormaza-Anaguano (2022) alcançaram a máxima atividade de lacase com o *Pleurotus ostreatus* utilizando o extrato de malte como fonte de carbono e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio com a razão de carbono-nitrogênio em 5,15:1. Além disso, utilizaram o *tween* 80 como indutor, sendo o teor de umidade da FES de 85%, os autores ainda selecionaram o tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 como o melhor para extração enzimática e assim com a otimização dessas etapas alcançaram um aumento de 4,6 vezes na atividade enzimática de lacase.

Dentre os íons que afetam a produção, íon cobre é o mais utilizado para otimização da produção de lacase (FERREIRA *et al.*, 2022), Othman *et al.* (2018) utilizou a fermentação submersa do *Agaricus bisporus* e constataram que a atividade de lacase foi melhorada na presença de Cu^{2+} , Ezike *et al.* (2020) utilizando a fermentação do *Trametes polyzona* verificou que o Cu^{2+} na concentração de 10-50 mM provocou um efeito levemente

estimulador para atividade de lacase. YADAV *et al.* (2019) ao otimizarem a produção de lacase obtiveram que a suplementação do meio de cultura com Tween-80 (0,75 mM) estimulou a produção de lacase e que os sais metálicos, sulfato de zinco, sulfato de ferro, sulfato de cobre e sulfato de magnésio quando utilizados como indutores também aumentaram a atividade de lacase.

Em contrapartida, YIN *et al.* (2017) ao utilizar a fermentação submersa do *Abortiporus biennis* relataram que os íons Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ e Zn^{2+} na concentração de 10 mM atuaram como inibidores da atividade de lacase. Já Mtibaá *et al.* (2018) com a FS do *Thielavia sp.* observaram que o melhor íon indutor para atividade de lacase foi o Mn^{2+} nas concentrações de 5 e 10 mM, enquanto que Hg^{2+} e Fe^{2+} atuaram como inibidores da enzima.

Com a lacase fúngica de peso molecular de 51 KDa sintetizada pela FES da *Alternaria alternata* nenhum dos íons metálicos adicionados (NaCl , MgSO_4 , KH_2PO_4 e CaCl_2) aumentaram a produção de lacase, como também nenhum dos açúcares (glicose, lactose, maltose, frutose e sacarose) aumentaram consideravelmente a atividade da lacase, já galactose e extrato de levedura foram usados como fonte ótima de carbono e nitrogênio respectivamente para maior produção de lacase. Logo, os autores concluíram que a aplicabilidade dessa enzima será definitivamente maior em efluentes sem esses íons metálicos (IRFAN *et al.*, 2018). Portanto, os fungos têm características únicas de produção de enzimas, que variam em diferentes condições de substratos e planejamentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo e condições de cultivo

A linhagem *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 foi isolada em 2018 do município de Serra Talhada, Caatinga, Região do Nordeste Brasileiro e está depositada na Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM). O fungo foi reativado a partir de uma solução de óleo mineral em meio caldo glicosado segundo a metodologia de Nascimento *et al.* (2015), sendo mantido em um agitador orbital por 72 horas em 120 rpm à 30°C, permitindo assim o seu desenvolvimento.

3.2 Seleção do meio de cultura sólido para esporulação

Após a reativação, a fim de selecionar o meio de cultivo que proporcionasse o

melhor crescimento e conseqüentemente melhor esporulação o fungo foi inoculado nos seguintes meios de cultura: Ágar czapek (CZ); Batata Dextrose Ágar (BDA); Ágar Sabouraud (SAB) e Ágar extrato de malte (EMA), sendo mantido na BOD a 30°C por 7 dias.

3.3 Método Qualitativo

Foi realizado de acordo com a metodologia de Senthivelan *et al.* (2019), em que o microrganismo foi inoculado em placa de Petri contendo o meio BDA (Batata- Dextrose- Ágar) com 3 mM de ABTS ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sendo mantidos por 7 dias em um BOD à 30°C e posteriormente foi verificado a formação de um halo na coloração verde ao redor do crescimento fúngico, que indica a secreção de lacase, o halo foi medido com o auxílio de um paquímetro sendo o resultado da medição expresso em milímetros.

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A condição de fermentação foi realizada segundo a metodologia de Nascimento *et al.* (2015), modificada pela adição da solução nutritiva de Xu *et al.* (2020). Sendo utilizado como substrato 3 g de farelo de trigo, casca de macaxeira e laranja com a granulometria entre 2,0 mm e 0,6 mm (submetidos previamente a teste de absorção), em 40% de umidade e concentração de esporos de 10^7 esporos/mL. A fim de selecionar o melhor tempo de produção para lacase foram analisadas com 48h, 72h, 96h e 120h decorridas de fermentação a 30°C em estufa incubadora de BOD.

A obtenção do líquido fermentado foi de acordo com Nascimento *et al.* (2015), utilizando água destilada na proporção de 7,5 mL para cada 1g de substrato, em agitador orbital em 120 rpm por 90 minutos.

3.5 Fermentação Submersa (FS)

Foi realizada usando meio MS-2 modificado (PORTO; TAKAKI e LIMA, 1996), no qual foram usados como substratos, farelo de trigo e farinha de soja, com a granulometria igual ou inferior a 0,6 mm, a concentração utilizada foi de 10^4 esporos/ mL. Além disso, em cada FS com ambos os substrato foram realizados três diferentes testes de produção, o

ensaio “a” com meio MS-2 modificado apenas a solução nutritiva de Xu *et al.* (2020), sem adição de ABTS; o ensaio “b” com o meio M-2 modificado com a solução nutritiva de Xu *et al.* (2020) e com a adição de 0,3 mM ABTS e o ensaio “c” com o meio MS-2 contendo a sua solução nutritiva padrão, modificado apenas pela adição de 0,3 mM ABTS. Esses testes foram realizados para verificar a produção de lacases como metabólito, conforme foi observado em algumas metodologias relatadas na literatura (ALVES, 2010; Jang *et al.*, 2002). Todos os ensaios da FS ocorreram em um agitador orbital em 120 rpm, a 30°C, no tempo total de 48h.

3.6 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método descrito por Smith *et al.* (1985) utilizando a albumina soro bovina como padrão.

3.7 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase realizada de acordo com a metodologia de Fontes (2019) na qual utiliza-se 0,3 mL de tampão acetato de sódio a 0,1M; 0,6 mL do extrato bruto e como reagente 0,1 mL do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) 0,5 mM, o tempo de reação é de 10 min sendo incubada a 30°C. A leitura é realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420nm com o coeficiente de extinção (ϵ) 36000. Esta metodologia foi utilizada também para a determinação das atividades de lacase com os extratos brutos oriundos da fermentação submersa.

3.8 Cálculo da atividade de lacase

A atividade de lacase foi calculada conforme a equação abaixo, também segundo a metodologia de Fontes (2019) na qual a unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto, expressa em U/L.

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t$$

Onde:

ΔA = Diferença entre a absorbância final e a inicial

V = Volume da reação (0,001 L)

10^6 = Fator de conversão (de ϵ moles para μ moles)

ϵ = Coeficiente de extinção ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

R = Quantidade de caldo enzimático (L)

T = Tempo de reação (min)

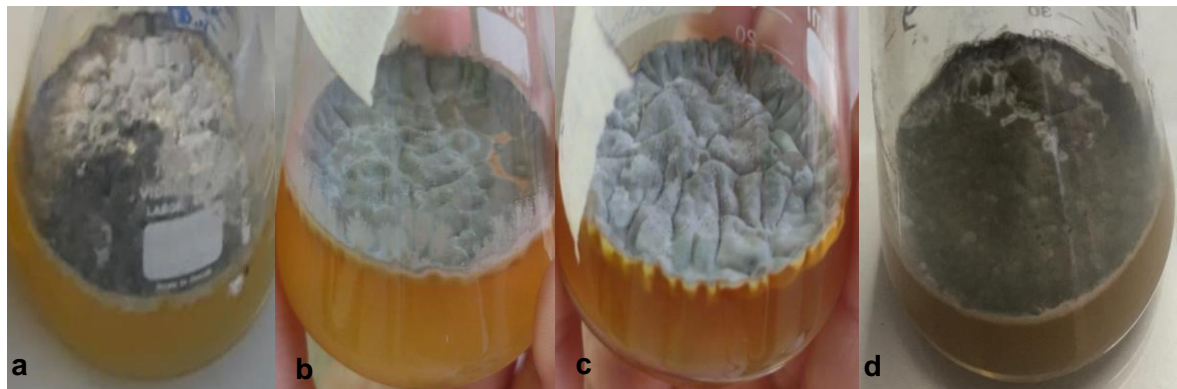
Entretanto, no final os valores foram convertidos de U/L para U/mL para que os resultados fossem melhores discutidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Microrganismo e condições de cultivo

Devido ser uma nova linhagem fúngica, foi observado o crescimento e esporulação *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 nos seguintes meios de cultura: Ágar czapeck (CZ); Batata Dextrose Agar (BDA); Ágar Sabouraud e Ágar extrato de malte (EMA), como bem pode ser constatado na figura 12 abaixo.

Figura 12 - A linhagem *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 nos meios de cultura com 7 dias de crescimento a 30°C.



a=Batata Dextrose Agar; b= Ágar Czapeck; c= Ágar Sabouraud; d= Ágar extrato de malte (EMA).

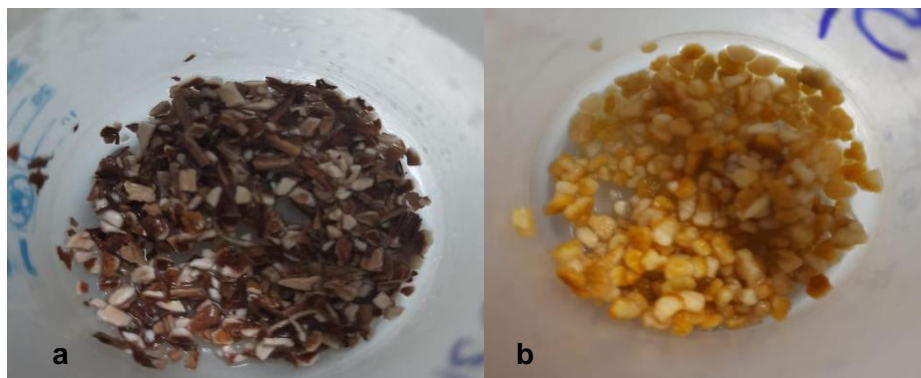
Fonte: Autor (2021).

Observa-se que o meio de cultivo que proporcionou o melhor crescimento para o *A. Serratalhadensis* foi o Ágar Sabouraud (SAB) (figura 12 c). Logo, o *A. serratalhadensis* URM 79/18 com pré inóculo nesse meio foi utilizado para contagem de esporos para a fermentação em estado sólido com os substratos de farelo de trigo, casca de macaxeira e de laranja, e para a fermentação submersa com os substratos de farelo de trigo e farinha de soja.

Na etapa de produção por fermentação em estado sólido, os substratos, foram submetidos a teste de absorção (figura 13) a fim de conhecer o teor de umidade de 40% para a FES. Pois de acordo com VAURIS *et al.* (2022) em processos de FES, a evaporação

acarreta em contribuições muito significativas para a remoção de calor, sendo assim, a capacidade de absorção de água é muito importante e deve ser levada em consideração.

Figura 13 -Teste de absorção



a= casca de macaxeira e b= casca de laranja.

Observação: o teor de umidade do farelo de trigo já era conhecido por isso não foi necessário fazer o teste

Fonte – Autor (2021).

O resultado do teste de absorção da casca de macaxeira apontou 0,8 mL/g de substrato e a da casca de laranja sendo de 1,5 mL/g. KUMAR *et al.* (2003) usam a FES do *Aspergillus niger* com o substrato de farelo de trigo, enriquecido com melaço ou sacarose, e observam a aglomeração do farelo de trigo com teor de umidade de 65%. POORNA e PREMA (2007) estudam a produção de endoxilânase de *Bacillus pumilus* cultivada em farelo de trigo e encontraram o melhor resultado para 71,4% de teor de umidade. Segundo os autores, a baixa capacidade de absorção reduz a capacidade de intumescimento do substrato, aumentando a tensão superficial da água e conseqüentemente reduzindo a atividade de água para a necessidade metabólica microbiana. Em oposição, substratos com alta capacidade de absorção da água reduzem os espaços interpartículas, resultando em menos espaço para crescimento microbiano e troca gasosa deficiente.

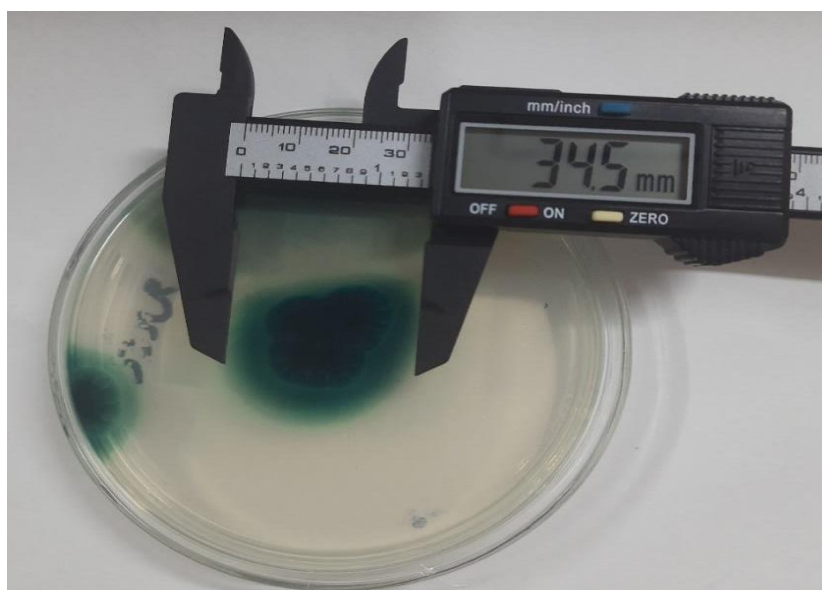
4.2 Teste qualitativo

Constatou-se a formação de um halo com coloração verde escuro devido à oxidação do substrato ABTS pela produção de lacase, como descrito pelo autor da metodologia Senthivelan *et al.* (2019). O halo que foi medido após 7 dias de inóculo do *A. serratalhadensis* com auxílio de um paquímetro teve 34,5 mm de diâmetro conforme pode ser observado na figura 14 abaixo.

De acordo com Senthivelan *et al.* (2019), o fungo *Penicillium chrysogenum* formou um halo também na coloração verde, indicando a produção extracelular de lacase por meio da oxidação do ABTS no meio. O autor não chegou a medir o tamanho do halo formado, mas observou-se pela comparação das figuras que o mesmo tem um tamanho inferior ao formado pela linhagem fúngica do *A. serratalhadensis* URM 79/18, indicando que o *A. serratalhadensis* URM 79/18 secreta mais lacases que o *Penicillium chrysogenum*.

Ao selecionar 60 fungos isolados de diferentes ambientes, ABDEL-AZEEM e SALEM (2012) realizaram o teste qualitativo em todas as espécies para a produção de lacase utilizando como substrato o guaicol, dentre os 60 fungos testados 16 oxidaram o substrato, indicando a secreção extracelular de lacase. Entretanto, apenas uma espécie indentificada como *Chaetomium globosum* formou um halo maior que o do *A. serratalhadensis* URM 79/18 sendo o halo formado de 40 mm.

Figura 14 – Halo formado pelo *A. serratalhadensis* URM 79/18 evidenciando a produção extracelular de lacase.



Fonte: Autor (2022).

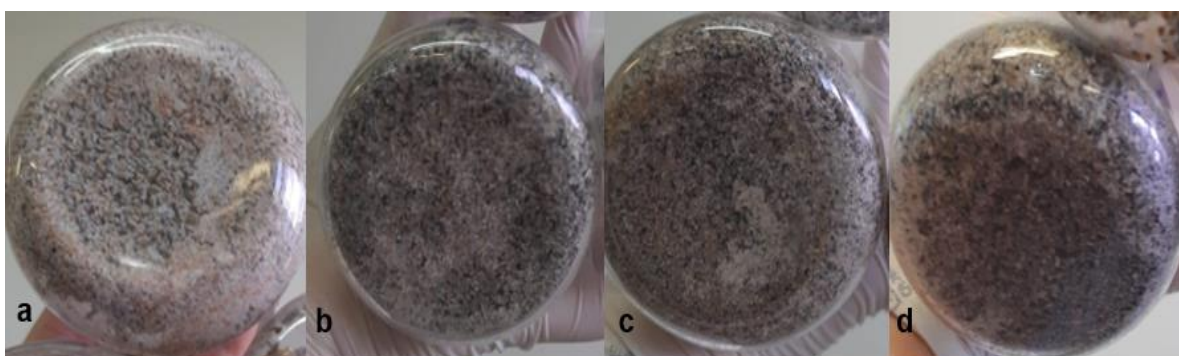
4.3 Produção e determinação de lacase oriunda da fermentação em estado sólido

O fungo *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 cresceu nos substratos utilizados em todos os tempos estudados (figuras 15 e 16), no entanto, o resíduo da casca de laranja utilizado apenas na FES não apresentou o crescimento da linhagem fúngica até o tempo

de fermentação de 96 horas, foi observado um crescimento muito lento, sendo visualizado esporos apenas no tempo de 120h de fermentação (figura 17).

O resíduo agroindustrial da casca de laranja foi utilizado como substrato na FES, pois segundo Lima (2014) os resíduos de frutas possuem elevado teor nutricional, com grande potencial para serem utilizados *in natura* ou como substratos em processos biotecnológicos e a FES tem sido apontada nos últimos anos como uma estratégia eficiente para obtenção de compostos bioativos a partir de resíduos agroindustriais.

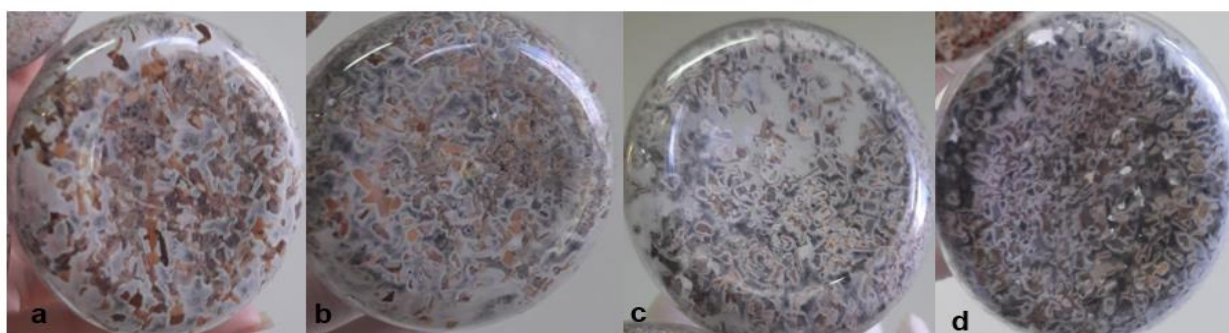
Figura 15 – A linhagem fúngica *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 na FES com o substrato de farelo de trigo.



a= 48h, b= 72h, c= 96h e d=120h de FES

Fonte: Autor (2022).

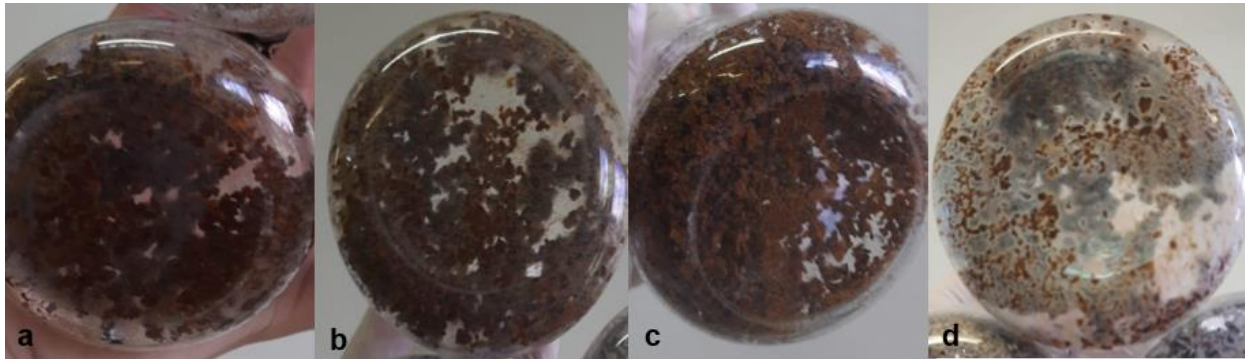
Figura 16 – A linhagem fúngica *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 na FES com o substrato de casca de macaxeira.



a= 48h, b= 72h, c=96h e d= 120h de FES.

Fonte: Autor (2021).

Figura 17- A linhagem fúngica *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 na FES com o substrato de casca de laranja.



a= 48h, b= 72h, c=96h e d= 120h de FES.

Fonte: Autor (2021).

De acordo com a literatura os compostos presentes na casca da laranja podem inibir o crescimento de algumas espécies fúngicas, pois no estudo de Hernández *et al.* (2021) os autores relataram que o extrato polifenólico da casca de laranja a 1,5 g/L inibiu (100%) o crescimento micelial e a germinação de conídios de três fungos estudados (*Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*). No entanto, o substrato da casca de laranja foi testado justamente pois e comumente relatado na literatura o uso de compostos fenólicos de origem vegetal para induzir a secreção de lacase (KUHAR e PAPINUTTI, 2014).

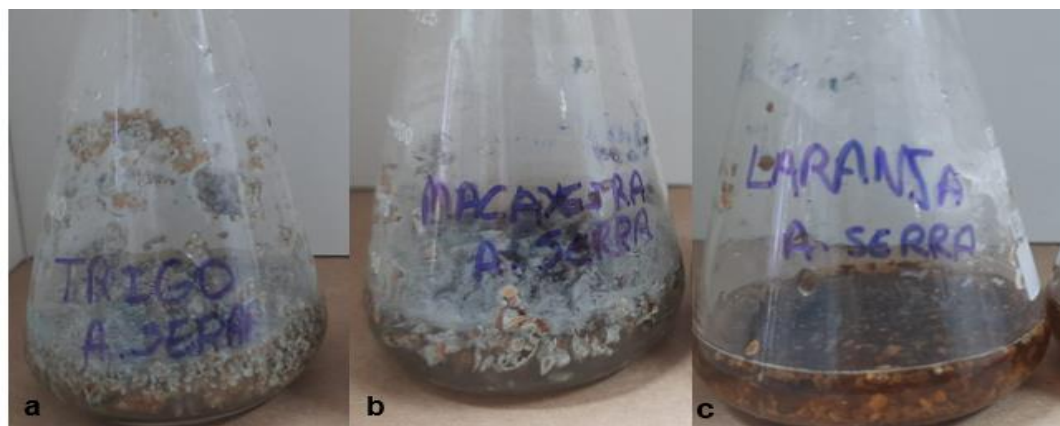
Segundo Lima (2014) ao avaliar o potencial de utilização de resíduos de acerola (*Malpigia glabra*) constatou-se um elevado teor de compostos fenólicos e flavonóides, porém ao realizar a FES do *Aspergillus niger* neste substrato não houve adaptação do microrganismo ao resíduo, o que também pode ter ocorrido com o *A. serratalhadensis*, visto que o microrganismo demorou para produzir esporos no substrato da casca de laranja, este fato levou a autora a utilizar outro substrato para a FES do *Aspergillus niger*.

Dessa forma, quando o objetivo é a produção de bioativos para indústria biotecnológica é interessante que a síntese desses metabólitos ocorra em tempo possível, por isso, este é o fator mais otimizado nos estudos relacionados a FES (SANTOS *et al.*, 2018). Além disso, o tempo de fermentação está diretamente relacionado com o esgotamento nutricional no meio, implicando na redução do crescimento microbiano, inviabilizando a conversão da biomassa em produtos e, conseqüentemente, reduzindo a produção de enzimas (SANTOS *et al.*, 2013).

Após a fermentação do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 com 48h, 72h, 96h e 120h usando como substratos farelo de trigo, casca de macaxeira e casca de laranja foi

realizada a extração do líquido fermentado, o qual foi utilizado para determinação da atividade enzimática de lacase (tabela 2) e do teor de proteína totais (tabela 4).

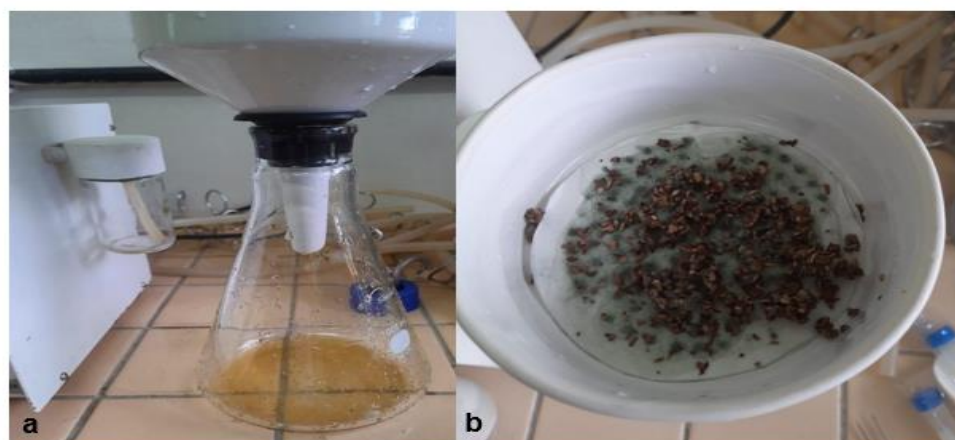
Figura 18 - Adição de água destilada após 72h de fermentação do *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 nos três substratos para obtenção do extrato bruto.



a = de farelo de trigo, b= casca de macaxeira e c = casca de laranja.

Fonte: Autor (2021)

Figuras 19 – Filtração a vácuo para separação da biomassa fúngica do extrato bruto.



a = extrato bruto/ b = biomassa fúngica

Fonte: Autor (2021).

Figura 20 - Extratos bruto obtidos com a fermentação da linhagem fúngica *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 usando como substrato farelo de trigo, casca de macaxeira e casca de laranja.



Fonte: Autor (2022).

As vantagens da FES em relação à Fermentação Submersa (FS) como uma técnica mais simples e de menor custo, além de alta produtividade, mais circulação de oxigênio, tecnologia simples e que se assemelha com a habitat natural de vários microrganismos (SILVA, 2014). Já a utilização de resíduos agroindustriais, os recursos mais abundantes e renováveis do planeta, como substratos para a fermentação em estado sólido, resultam na redução da deterioração do meio ambiente, e também evitam a perda de material potencialmente valioso que pode ser processado para produzir uma série produtos adicionais, tais como alimentos, combustíveis, as enzimas e outras biomoléculas. (SINGH; GUPTA; ANTHWAL, 2009).

As atividades metabólicas ocorrem principalmente perto da superfície do substrato e no interior dos poros; no entanto, pode haver um transporte de substâncias a partir da penetração de hifas aéreas. Enzimas hidrolíticas, que são produzidas pelo micélio, difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores. Assim, o substrato é tomado pelo fungo para servir como nutrientes, como bem pode ser observado nas figuras 15 e 16 acima. O oxigênio é consumido e o gás carbônico, água, calor e outros produtos bioquímicos são produzidos durante a fermentação (HÖLKER e LENZ, 2005).

Tabela 2 – Resultado das atividades de lacase em U/mL produzida pelo fungo *A. serratalhadensis* URM 79/18 nos substratos de farelo de trigo, casca de macaxeira e casca de laranja, nos tempos de 48 horas até 120 horas de FES.

Substrato	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Trigo	305,556	296,296	32,407	0
Macaxeira	113,426	293,981	43,981	0
Laranja	0	0	0	0

Aspergillus serratalhadensis URM 79/18 teve a maior atividade de lacase no substrato farelo de trigo com tempo de fermentação de 48h sendo de 305,556 U/mL, sendo seguida pela do tempo de 72h na qual foi de 296,296 U/mL. Assim como, também foi determinado a atividade enzimática com o substrato de macaxeira com tempo de 72 horas de fermentação, na qual o resultado foi de 293,981 U/mL. Ao utilizar o *Aspergillus flavus* tendo como substrato a árvore *Platanus orientalis* a produção máxima de enzimas lignolíticas foi alcançada com 120h de FES à temperatura de 32°C e após a precipitação com 50% de sulfato de amônio a máxima atividade de lacase no sobrenadante foi de 77,78 U/mL (KHAN *et al.*, 2020).

Na fermentação em que a casca de laranja foi usada como substrato não houve crescimento fúngico e conseqüentemente não houve produção enzimática. Além disso, o extrato bruto oriundo da FES do substrato da casca de laranja apresentou muito pigmento ultrapassado a coloração de leitura do espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm utilizado para determinação da atividade.

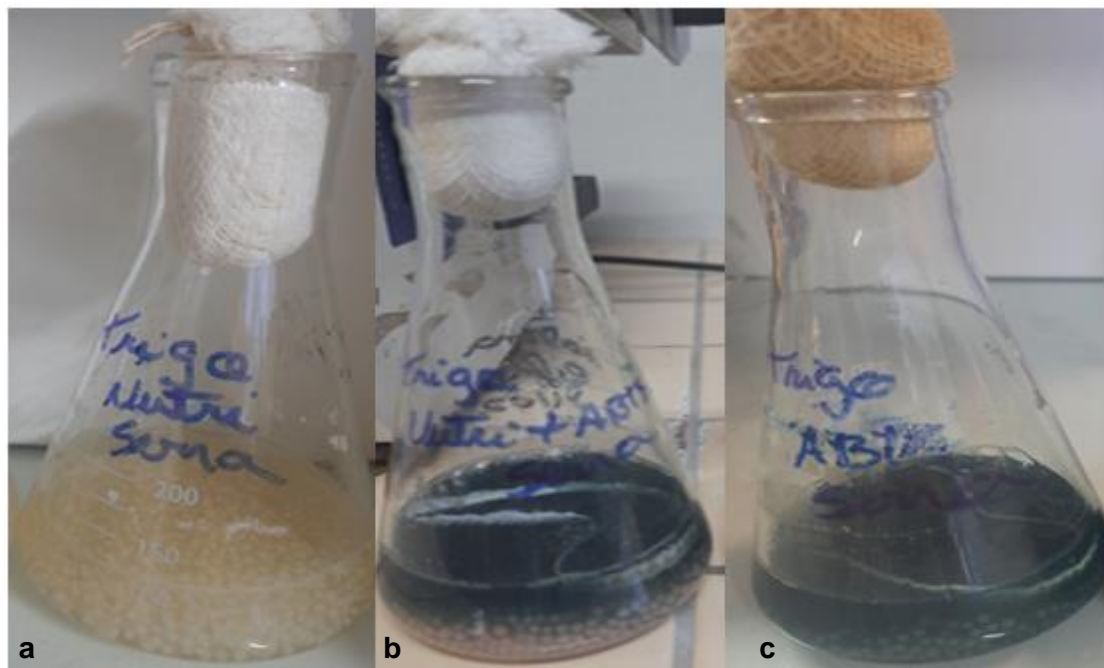
Os resíduos agroindustriais apresentam de uma forma geral em sua composição celulose, hemicelulose e lignina (TAMANINI e HAULY, 2004). Assim, a composição lignocelulósica desses substratos contribuem para a produção de enzimas ligninolíticas com grande potencial oxidativo como as lacases. No entanto, a eficiência da FES para produção de enzimas vai além das escolhas corretas de substrato e agente biológico, sendo necessárias adequações de parametros físico-químicos do processo (SANTOS *et al.*, 2018).

4.4 Produção e determinação de lacase oriunda da fermentação submersa

Para que a aplicação de lacase seja bem sucedida é necessária que a sua produção seja feita em grandes quantidades. Logo, além de estudar os fatores ambientais da produção, muitos autores têm considerado a adição de indutores no meio de cultura, inclusive o indutor pode ser um substrato da própria enzima (ALVES, 2010). De acordo com Jang *et al.* (2002) a adição de ABTS com xilidina na produção de lacases por *Trametes* sp. mostrou ser o indutor mais eficiente, com um aumento na atividade de 3,59 vezes em relação ao controle, enquanto que a xilidina sozinha apresentou um aumento de 2,84 vezes.

Na FS do *A. serratalhadensis* URM 79/18 realizada usando o meio MS-2 modificado, em alguns testes adicionou-se 0,3 mM de ABTS a solução nutritiva do meio para verificar a produção de lacases como metabólito, conforme foi observado em algumas metodologias relatadas na literatura, também foi testada a produção de lacase através da FS modificando a solução nutritiva do meio MS-2 pela nutritiva de Xu *et al.* (2020).

Figura 21 - *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 no substrato de farelo de trigo após 48h em 120 rpm a 30° C de FS.



a = meio MS-2 modificado apenas pela solução nutritiva de Xu *et al.* (2020), sem adição de ABTS; b = meio MS-2 modificado com a solução nutritiva de Xu *et al.* (2020) e adição de ABTS; c = meio MS-2 com a sua solução nutritiva padrão modificado apenas pela adição de ABTS.

Fonte: Autor (2022).

Figura 22 - *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 no substrato de farinha de soja após 48h em 120 rpm a 30° C de FS.



a = meio MS-2 modificado com a solução nutritiva de Xu *et al.* (2020), sem adição de ABTS; b = meio M-2 modificado com a solução nutritiva de Xu *et al.* (2020) e adição de ABTS; c = meio MS-2 com a sua solução nutritiva padrão, modificado apenas pela adição de ABTS.

Fonte: Autor (2022)

Com base nas figuras (21 e 22) oriundas da FS do *A. serratalhadensis* é possível constatar a secreção de lacase, indicada pela coloração verde, provocada pela oxidação do ABTS, verifica-se a coloração verde mais escura nos meios contendo o ABTS em que foi utilizado o farelo de trigo como substrato (figura 21 b e c), já o meio contendo o ABTS oriundo da FS utilizando como substrato a farinha de soja (figura 22) é possível verificar uma coloração verde numa tonalidade bem mais clara, indicando a baixa secreção de lacase, a qual foi constatada por meio da metodologia quantitativa (tabela 3).

Também constata-se que os extratos brutos oriundos da FS tendo como substrato o farelo de trigo e a farinha de soja, que não tinham ABTS, tiveram uma coloração bem mais clara, sem pigmentação (figuras 21a e 22a), do que os extratos oriundos da FES, diante da utilização do mesmo substrato, farelo de trigo (figura 21b e c) que tiveram bastante pigmentação. FEITOSA (2009) relata em seu estudo que uma vantagem da FS em relação a FES é que torna fácil a recuperação das enzimas extracelulares. Assim, o produto final da FES pode possuir mais impurezas em relação aos da FS, conseqüentemente acarretando em custos mais elevados para a purificação e recuperação dos metabólitos desejados (BEHERA e RAY, 2016; COSTA *et al.*, 2018).

Tabela 3 – Resultado da fermentação submersa do *A. serratalhadensis* após 48h em 120 rpm em temperatura ambiente, nos substratos de farelo de trigo e farinha de soja

a atividade de lacase determinada por Fontes (2019) com tempo de 5 e 10 min de reação com ABTS e resultados expressos em U/mL.

Substratos	Trigo 5 min	Trigo 10 min	Soja 5 min	Soja 10 min
Condição	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)
ABTS	0,00	0,00	0,1111	0,0625
Nutritiva + ABTS	0,1944	0,00	0,1574	0,0416
Só nutritiva	0,00	0,00	0,0185	0,00

Ao utilizar a fermentação submersa do *Aspergillus* sp. para a produção de lacase, a maior atividade enzimática nas condições de 150 rpm e 28°C foi de 0,3 U/L com o tempo total de fermentação de 96h e após o tempo de 120h de fermentação a atividade para lacase foi decaindo em todos os meios testados para a FS (MELO *et al.*, 2015). A reprodutibilidade de cultivos submersos pode ser altamente afetada pela transferência de massa de oxigênio. Logo, se o oxigênio se tornar limitado, os fungos filamentosos mudarão para o metabolismo parcialmente anaeróbico, o que pode afetar a quantidade de enzima produzida. Em cultivos submersos, a degradação do produto por proteases pode resultar da autólise e fragmentação das hifas, que ocorrem frequentemente no final da fase estacionária (HANSEN *et al.*, 2015).

Além disso, de acordo com IKEHATA *et al.* (2004) é de suma importância saber se a cepa fúngica tem um desempenho ideal em fermentação submersa ou sólida, dessa forma, com base nos resultados expressos nas tabelas acima constata-se que a cepa fúngica do *A. serratalhadensis* URM 79/18 tem desempenho ideal na fermentação em estado sólido, sobretudo quando utilizado como substrato o resíduo agroindustrial farelo de trigo. A FES tem gerado maiores rendimentos enzimáticos quando comparada com a FS (PIROTA *et al.*, 2015).

4.5 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação de proteína total oriundas da FES e FS do *A. serratalhadensis* está descrita nas tabelas 4 e 6 abaixo sendo a quantidade máxima de proteína total de 2,02 mg/mL obtida com 120 horas de FES usando o substrato farelo de trigo e a mínima de 1,22 mg/mL obtida também com 120 horas de FES, no entanto tendo como substrato a casca de macaxeira, devido o alto teor de pigmento obtido nas fermentação em que foram

usadas como extrato bruto a casca de laranja os seus valores ultrapassaram o limite de leitura máximo do equipamento. Já na FS o maior teor de proteínas foi 0,825 mg/mL obtido com o substrato farelo de trigo sem adição de indutor a fermentação.

Observa-se que o tempo e o substrato que mais produziram proteínas totais não foram os mesmo que tiveram alta atividade enzimática de lacase. Pois a dosagem de proteínas totais não é específica; o que significa que o mesmo microrganismo ao apresentar alta dosagem de proteínas totais em um determinado tempo de fermentação e baixa atividade enzimática de lacase neste mesmo tempo e em outros tempos ter alta atividade de lacase, provavelmente este microrganismo pode apresentar atividades para outros grupos de enzimas, como proteases, nesses outros tempos de fermentação em que foram observados alto teor de proteínas e baixa atividade enzimática de lacase, devido ao crescimento fúngico nos substratos.

Tabela 4 – Resultado da determinação de proteína total em mg/mL, referentes a fermentação em estado sólido do *A. serratalhadensis* nos substratos de farelo de trigo, casca de macaxeira e casca de laranja, com tempo de 48h a 120h.

Substrato	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Trigo	1,69375	1,516875	1,520625	2,02
Macaxeira	1,365625	1,62625	1,391875	1,220625
Laranja	+++	+++	+++	+++

Observação: +++ ultrapassou a capacidade de leitura do leitor de microplaca.

Tabela 5 – Resultado da determinação de proteína total em mg/mL, referentes a FS do *A. serratalhadensis* com 48h de FS utilizando como substrato farelo de trigo e farinha de soja.

Substratos	Trigo	Soja
Condição	(mg/mL)	(mg/mL)
ABTS	0,5418	0,579375
Nutritiva + ABTS	0,5737	0,538125
Só nutritiva	0,8256	0,64875

Portanto, a linhagem *A. serratalhadensis* apesar de no teste qualitativo realizado ao adicionar ABTS ao meio de fermentação produzir a coloração verde indicando a síntese

de lacase, com base na metodologia quantitativa a produção da enzima foi de 0,1944 U/mL ao utilizar o farelo de trigo como substrato e de 0,1574 U/mL ao utilizar a farinha de soja como substrato.

Junior *et al.* (2019) em seu estudo utilizou o fungo *Pleurotus sajor-caju* para a produção de lacase e com 144h de fermentação submersa obteve 130,3 U/L, sendo a máxima atividade enzimática de lacase, no entanto, ao utilizar sistemas aquosos de duas fases (SDFA) para purificação da enzima e para otimizar a produção, o autor usou diferentes concentrações de indutores (etanol e CuSO₄) que foram capazes de aumentar em 4 vezes a atividade enzimática. Logo, a atividade enzimática máxima foi de 539,4 U/L sendo obtida com 72h de fermentação submersa e usando 0,4 Mm de CuSO₄ como indutor. Entretanto, neste trabalho não foi realizada nenhuma etapa de otimização da produção nem etapas de purificação e foi obtido 305,556 U/mL de atividade enzimática para lacase em apenas 48 horas de fermentação em estado sólido do fungo *A. serratalhadensis* URM 79/18 usando farelo de trigo como substrato.

5. CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido do *A. serratalhadensis* URM 79/18 foi ideal para a produção de lacases, sobretudo ao utilizar o farelo de trigo como substrato, sendo este resultado inédito ao utilizar esta linhagem fúngica. Além de que a melhor produção ocorreu em um tempo de apenas 48h de fermentação, sendo um tempo bem inferior aos relatados na literatura. Portanto, conclui-se que o microrganismo em questão é produtor da enzima lacase, sendo necessários mais estudos para otimização da sua produção e possível aplicação industrial.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZEEM, A. M; SALEM, F. M. Biodiversity of laccase producing fungi in Egypt. **Mycosphere** , v. 3, n. 5, pág. 900-920, 2012.

ABREU, J. A. S.; RODOVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **UNINGÁ**, v. 21, n.1, p. 55-59, 2015.

AGRAWAL, K; CHATURVEDI, V; VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2018.

AGUIAR, A; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova** , v. 34, p. 1729-1738, 2011.

ALVES, F. **Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lacase**. 2010. 91 f. Dissertação (mestrado em engenharia de processos químicos e bioquímicos) - Programa de Pós Graduação. Linha de pesquisa: Projeto, análise e controle de processos industriais - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, São Paulo.

BAPTISTA, N. M. Q. *et al.* Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, 2012.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Otimização da produção de lacase e sua aplicação na deslignificação de biomassa. **Revista Internacional de Reciclagem de Resíduos Orgânicos na Agricultura**, v. 6, n. 4, pág. 351-365, 2017.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BONUGLI-SANTOS, R. C. *et al.* Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659-8668, 2016.

BRASIL DESENVOLVE ENZIMA PARA GERAR AÇÚCAR E ETANOL DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR, **União Nacional da Bioenergia**. 2020. Disponível em <<https://www.udop.com.br/noticia/2020/5/28/brasil-desenvolve-enzima-para-gerar-acucar-e-etanol-do-bagaco-e-da-palha-da-cana-de-acucar.html>>. Acesso em: 12 de julho de 2022.

CASCIATORI, F. P. *et al.* Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103-116, 2016.

CHEN, M. *et al.* Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds. **RSC Advances**, v. 5, n. 65, p. 52307–52313, 2015.

CONTATO, A. G. *et al.* Prospection of fungal lignocellulolytic enzymes produced from jatoba (*Hymenaea courbaril*) and tamarind (*Tamarindus indica*) seeds: Scaling for bioreactor and saccharification profile of sugarcane bagasse. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 533, 2021.

COSTA, J. A. V. *et al.* Chapter 16- Solid-state fermentation for the production of biosurfactants and their applications. **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, p. 357-372, 2018.

DADHEECH, T. *et al.* Draft genome analysis of lignocellulolytic enzymes producing

Aspergillus terreus with structural insight of β -glucosidases through molecular docking approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 181-190, 2019.

DAMARE, S. *et al.* A deep-sea hydrogen peroxide-stable alkaline serine protease from *Aspergillus flavus*. **3 Biotech**, v. 10, n. 12, p. 1-9, 2020.

DEBNATH, R; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101645, 2020.

DESKA, M; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as "green catalyst" for the decolourization process—State of the art. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 112-123, 2019.

DIAS, M. C. *et al.* Eco-friendly laccase and cellulase enzymes pretreatment for optimized production of high content lignin-cellulose nanofibrils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 413-425, 2022.

DÍAZ, A. B. *et al.* Melhorar a produção de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus awamori* em bagaço de uva suplementado. **Processamento de Alimentos e Bioprodutos**, v. 90, n. 1, pág. 72-78, 2012

EL-ENSHASY, H. A. Culturas de fungos filamentosos – características de processo, produtos e aplicações. **Bioprocessamento para produtos de valor agregado a partir de recursos renováveis**, p. 225-261, 2007.

ERGUN, S. O; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273-277, 2017.

EZIKE, T. C. *et al.* Purification and characterisation of new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00566, 2020.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FERREIRA, J. A. *et al.* Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334-345, 2016.

FERREIRA, J. V. S. *et al.* Lacases produzidas por microrganismos: uma revisão. *In*: OLIVEIRA, V. M. *et al.* **Biotecnologia Ambiental**. 1. ed. Bélem-PA: RFB Editora, 2021. p. 11-23.

FERREIRA-LEITÃO, V. *et al.* Resíduos de biomassa no Brasil: disponibilidade e usos potenciais. **Valorização de Resíduos e Biomassa**, v. 1, n. 1, pág. 65-76, 2010.

FONTES, B. J. **Caracterização de lacases produzidas por fungos basidiomicetos de origem marinha e terrestre e aplicação biotecnológica na descoloração de corante**

têxtil. 2019. 81 f. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro.

FOOD LOSS AND WASTE DATABASE. **Organização Das Nações Unidas Para Agricultura e Alimentação, FAO**. 2019. Disponível em <<http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>>. Acesso em: 26 de agosto de 2022.

FRANÇA, Í. B; SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 51331-51345, 2021.

GALHAUP, C. *et al.* Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.

GAVNHOLT, B; LARSEN, K. Biologia molecular de lacases de plantas em relação à formação de lignina. **Physiologia plantarum**, v. 116, n. 3, pág. 273-280, 2002.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2013.

GUARRO, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. **Enferm. Infecc Microbiol Clin**, v. 30, n. 1, p. 33–39, 2012.

GUERRERO-URRUTIA, C. *et al.* Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 169-175, 2021.

GUIMARÃES, N. C. A *et al.* Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102233, 2022.

GUPTA, R. *et al.* Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC). **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p. 182-190, 2018.

HASAN, F; SHAH, A. A; HAMEED, A. Aplicações industriais de lipases microbianas. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, pág. 235-251, 2006.

HANSEN, G. H. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

HEITMAN, J. *et al.* **The fungal kingdom**. John Wiley & Sons, 2020.

HEITMAN, J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. **Fungal biology reviews**, v. 25, n. 1, p. 48-60, 2011.

HERNÁNDEZ, A. *et al.* Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. **Fungal Biology**, v. 125, n. 2, p. 143-152. 2021.

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, v. 451, p. 186-190, 1999.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, jun. 2005.

HUBKA, V. *et al.* Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 912–37, 2013.

IKEHATA, K; BUCHANAN, I. D; SMITH, D. W. Desenvolvimentos recentes na produção de peroxidases fúngicas extracelulares e lacases para tratamento de resíduos. **Revista de Engenharia e Ciência Ambiental**, v. 3, n. 1, pág. 1-19, 2004.

INTASIT, R. *et al.* Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 173, p. 108086, 2021.

IRFAN, M. *et al.* Optimized production, purification and molecular characterization of fungal laccase through *Alternaria alternata*. Turkish Journal of Biochemistry, v. 43, n. 6, p. 613-622, 2018.

JANG, M. *et al.* Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 741-746, 2002

JAMES, T. Y. *et al.* Toward a fully resolved fungal tree of life. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n.1, p. 291-313, 2020.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 193-199, 2000.

JUNIOR, J. A. *et al.* Sequential degradation of raw vinasse by a laccase enzyme producing fungus *Pleurotus sajor-caju* and its ATPS purification. **Biotechnology Reports**, dec. 2019.

KHAN, Jehangir *et al.* Proximate analysis of lignocellulosic biomass and its utilization for production, purification and characterization of ligninolytic enzymes by *Aspergillus flavus*. **Archives of Environmental Protection**, v. 46, n. 1, 2020.

KHOOTAMA, A; PUTRI, D. N; HERMANSYAH, H. Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. **Energy Procedia**, v. 153, p. 143-148, 2018.

KLONOWSKA, A. *et al.* Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 6119-6125, 2002.

- KUHAR, F; PAPINUTTI, L. Otimização da produção de lacase por duas linhagens de *Ganoderma lucidum* utilizando indutores fenólicos e metálicos. **Revista Argentina de Microbiologia** , v. 46, n. 2, pág. 144-149, 2014.
- KUMAR, D. *et al.* Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1731-1738, 2003.
- KUMAR, R. *et al.* Optimization of lacase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v. 14, p.125-131. 2016.
- KUMAR, V. *et al.* Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124566, 2021.
- LEE, S. J *et al.* Fungos decompositores de palha de arroz e suas enzimas celulolíticas e xilanolíticas. **Revista de microbiologia e biotecnologia** , v. 21, n. 12, pág. 1322-1329, 2011.
- LI, Y. *et al.* A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, v. 31, n. 8, p. 1653-1665. e5, 2021.
- LIMA, J. S. **Fermentação em estado sólido de resíduos do processamento de frutas: acerola (*Mapighia glabra* L.), mangaba (*Harconia speciosa*) e graviola (*Annona muricata*) para a obtenção de compostos bioativos**. 2014. 99 f. (Dissertação de mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFS), São Cristovão, SE.
- LIMA, V. M. G. *et al.* Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, p.105-110, 2003.
- LIU, J. *et al.* Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. **J. Clean. Prod**, v.127, p. 600- 609, 2016.
- LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LOPES, F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. 2011. 130 f. Dissertação (mestrado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.
- LUNDELL, T. K.; MÄKELÄ, M. R.; HILDEN, K. Enzimas modificadoras de lignina em basidiomicetos filamentosos – revisão ecológica, funcional e filogenética. **Journal of basic microbiology** , v. 50, n. 1, pág. 5-20, 2010.
- NAIK, B. *et al.* Optimization of pullulanase production by *Aspergillus flavus* under solid-state fermentation. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100963, 2022.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Biologia Celular eucariótica e microorganismos eucarióticos**, In: Microbiologia de Brock, Prentice Hall, 10ed, São Paulo, 2010.

MAHAPATRA, S; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 627-634, 2013.

MANFREDINI, P. G. **Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação em estado sólido**. 2020. 173 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

MARTÍNEZ, C. S.; MARTÍN, J. P. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. **Current opinion in Microbiology**, v. 4, n.2, p. 214-2021, 2001.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MEHANDIA, S. *et al.* Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. **Biotechnology Reports**, v. 25, 2020.

MEINI, M. R. *et al.* Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101168, 2021.

MELNICHUK, N. *et al.* Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. **Waste Management**, v. 106, p. 155-161, 2020.

MELO, T. L *et al.* Avaliação do Potencial de Amostras de *Aspergillus ssp* Isoladas da Caatinga para produção de Lacase. **e-xacta**, v. 8, n. 1, p. 67-75, 2015.

MESQUITA, M. O. M; PINTO, T. M. F; MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p.119-249, 2017.

MONDAL, S. *et al.* Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. **Industrial crops and products**, v. 150, p. 112409, 2020.

MONCIARDINI, P. *et al.* Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MTIBAÁ, R. *et al.* Purificação e caracterização de uma lacase fúngica do ascomiceto *Thielavia sp.* e seu papel na descoloração de um corante recalcitrante. **Revista internacional de macromoléculas biológicas** , v. 120, p. 1744-1751, 2018.

NASCIMENTO, T. J. *et al.* Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Scientific Research Publishing**, v. 3, p. 81-91, sep. 2015.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

ORNELA, P. H. O. 2022. 69 f. **Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

OTHMAN, A. M.; SANROMÁN, M. Á; MOLDES, D. Estudo cinético e termodinâmico da lacase reticulada em carreador glioxil Immobead 150P: Caracterização e aplicação para bioenxertia de madeira de faia. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 150, p. 109865, 2021.

OTHMAN, A. M. *et al.* Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 1142-1148, 2018.

PANESAR, P. S. *et al.* Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl Food Biotechnol**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.

PAPADAKI, E. *et al.* Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, p.123317, 2020.

PAPAGIANNI, M. Morfologia fúngica e produção de metabólitos em processos miceliais submersos. **Avanços da biotecnologia**, v. 22, n. 3, pág. 189-259, 2004.

PHILIPPOUSSIS, A. N. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**. p. 163-196, 2009.

PIROTA, R. D. P. B. *et al.* Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para a produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n.9, p. 1606-1612.

POORNA, C. A; PREMA, P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. **Bioresource technology**, v. 98, n. 3, p. 485-490, 2007

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour médium. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 60, p.115-122, 1996.

RAMAMOORTHY, N. K; SAMBAVI, T. R.; SAHADEVAN, R. Assessment of fed-batch

strategies for enhanced cellulase production from a waste lignocellulosic mixture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, p. 107387, 2019.

RAZALI, S. A ; RASIT, N; OOI, C. K. Statistical analysis of xylanase production from solid state fermentation of rice husk associated fungus *Aspergillus niger*. **Materials Today: Proceedings**, v. 39, p. 1082-1087, 2021.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária . Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. 2010. 131f. Dissertação (mestrado em engenharia química) - Universidade Federal da Uberlândia, Uberlândia.

RODGERS, C. J. *et al.* Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. **Trends Biotechnol**, v. 28, v. 2, p. 63-72, fev 2010.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 57-62, jan./abr. 2001.

SADH, P. K; DUHAN, S; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2018.

SANÉ, S. *et al.* Using planktonic microorganisms to supply the unpurified multi-copper oxidases laccase and copper efflux oxidases at a biofuel cell cathode. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 231–238, abril 2014.

SANTOS, A. F. A. *et al.* Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 25663-25676, 2020.

SANTOS, P. S. *et al.* Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **JCEC**, v.4, n. 2, p. 1-8, 2018.

SANTOS, R. S. *et al.* Mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de transição dimórfica em fungos patogênicos humanos. **Rev. Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 105-116, 2012.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido utilizando Pedúnculo de Caju como substrato**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN.

SANTOS, T. C. *et al.* *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir de farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol**, v. 80, n.1. p. 65-71, 2013.

SENTHIVELAN, T. *et al.* Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface

methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). **Biotechnology Reports**, v. 23, e00344, april 2019.

SHARMA, A. *et al.* Flavonoid-rich agro-industrial residues for enhanced bacterial laccase production by submerged and solid-state fermentation. **3 Biotech.**, v. 7, n. 3. 2017.

SHARMA, G. *et al.* Lignocellulolytic enzymes from *Aspergillus allahabadii* for efficient bioconversion of rice straw into fermentable sugars and biogas. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127507, 2022.

SILVA, O. S. **Produção de Proteases por Linhagens de *Aspergillus* e extração em Sistema de Duas Fases Aquosas**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation, **Biochem. Eng. J**, v. 44 p. 13–18, 2009.

SINGH, P.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, p. 13–33, 2009.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, oct. 1985.

TAMANINI, C. HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de Xilitol. **Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TAXONOMY/BROWSER *Aspergillus serratalhadensis*. **NCBI**, 2022. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=2283851>>. Acesso em: 10 de agosto de 2022.

TORRES-LEÓN, C. *et al.* Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. **Lwt**, v. 112, p. 108236, 2019.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Monitoramento de bioprocessos submersos. **Revisões críticas em biotecnologia**, v. 19, n. 4, pág. 277-316, 1999.

VALLADARES-DIESTRA, K. K; VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCO, C. R. A biorefinery approach for enzymatic complex production for the synthesis of xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125174, 2021.

VAURIS, A. *et al.* A novel method to assess heat transfer and impact of relevant physicochemical parameters for the scaling up of solid state fermentation systems. **Biotechnology Reports**, v. 36, p. 00764, 2022.

VELÁSQUEZ-QUINTERO, C; MERINO-RESTREPO, A; HORMAZA-ANAGUANO, A. Produção, extração e quantificação de lacase obtida a partir de uma fermentação otimizada em estado sólido de sabugo de milho com fungos de podridão branca. **Journal of Cleaner Production**, p. 133598, 2022.

VISWANATH, B. *et al.* Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1129-1133, 2008.

WANG, W. *et al.* The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Gene**, v. 563, p. 142-149, 2015.

XU, L. *et al.* Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. **Journal of Environmental Management**, v. 270, 110904, 2020.

YADAV, Mukesh *et al.* Secretory laccase from *Pestalotiopsis* Species CDBT-F-G1 fungal strain isolated from high altitude: Optimization of its production and characterization. **Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 340, 2019.

YIN, L. *et al.* Induction, purification, and characterization of a thermo and pH stable laccase from *Abortiporus biennis* J2 and its application on the clarification of litchi juice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 5, p. 1033-1040, 2017.

YUAN, H. *et al.* Enhanced decolourization efficiency of textile dye Reactive Blue 19 in a horizontal rotating reactor using strips of BNC-immobilized laccase: Optimization of conditions and comparison of decolourization efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, jan. 2020.

ZHANG, Y. *et al.* O papel crucial das lacases bacterianas na biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo. **Revista Mundial de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 36, n. 8, pág. 1-10, 2020.

ZHAO, C; DENG, L; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 93-98, 2018.

ZOFAIR, F. F. S., AHMAD, S., HASHMI, M. A., KHAN, S. H., KHAN, M. A., YOUNUS, H. Catalytic roles, immobilization and management of recalcitrant environmental pollutants by laccases: Significance in sustainable green chemistry. **Journal of Environmental Management**, v. 309, e114676, 2022.

7. APÊNDICES

Para determinação da atividade enzimática de lacase com o extrato bruto oriundo da fermentação em estado sólido foram utilizadas as metodologias que estão descritas abaixo:

7.1 Metodologia de Ergun e Urek (2017)

Metodologia de Ergun e Urek (2017) modificada, inicialmente as amostras foram

centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente 50µL das amostras centrifugadas foram inseridas em uma microplaca de 96 poços, em seguida foi inserido 160 microlitros de ABTS ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) 0,002 molar diluído em tampão fosfato de sódio pH 5,15 e foi encaminhado para estufa a 30°C e a leitura para a atividade de lacase foi realizada num leitor de microplaca no comprimento de onda de 405 nm. A atividade enzimática foi definida como 1U a quantidade de enzima que transforma 1 µmol de substrato/minuto.

7.1.2 Resultado e discussão

Tabela 6 - Resultado das atividades de lacase em U/mL produzida pelo fungo *A. serratalhadensis* em fermentação em estado sólido utilizando como substrato o farelo de trigo com tempo de fermentação de 72h.

Microrganismo	Substrato	Atividade de lacase (U/mL)
<i>A. serratalhadensis</i>	Farelo de trigo	450,429

Ergun e Urek (2017), os autores desta metodologia relataram em seu estudo que a máxima atividade de lacase produzida por *Pleurotus ostreatus* com 408 horas de fermentação em estado sólido usando como resíduo casca de batata foi de 6708,3 U/L ± 75. Sendo o resultado da atividade de lacase produzida pelo *Aspergillus serratalhadensis* inédito e interessante, pois a fermentação também em estado sólido ocorreu em apenas 72 horas tendo como substrato o farelo de trigo.

7.2 Metodologia de Kumar *et al* (2016)

Foram inseridos 100µL das amostras com 900µL de ABTS (0,1 mmol em tampão acetato de sódio pH 5) em seguida encaminhado a câmara escura durante 3, 6, 9 e 12 minutos à 30°C. A atividade extracelular de lacase foi medida espectrofotometricamente, a reação foi monitorada medindo a alteração no espectrofotômetro a 436 nm por 3, 6, 9 e 12 min e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de ABTS por minuto a 27°C, e as atividades foram expressas em U/mL.

7.2.1 Resultado e discussão

Com o objetivo de realizar um estudo cinético sobre as lacases produzidas pelo *A. Serratalhadensis* foi realizada a determinação da atividade enzimática de lacase com a metodologia de Kumar *et al* (2016) no tempo de reação de 3, 6, 9 e 12 minutos de reação. Sendo possível observar que com o aumento no tempo de reação a atividade de lacase foi reduzida.

Tabela 7 - Determinação da atividade enzimática de Lacase em U/mL, em diferentes tempos de reação.

Microrganismo	Atividade de Lacase (U/mL)^a	Atividade de Lacase (U/mL)^b	Atividade de Lacase (U/mL)^c	Atividade de Lacase (U/mL)^d
A. <i>serratalhadensis</i>	87,443	44,045	28,499	21,051

a metodologia de Kumar *et al* 2016 com tempo de reação de 3 minutos em U/mL; b mesma metodologia com tempo de reação de 6 minutos em U/mL; c mesma metodologia com tempo de reação de 9 minutos em U/mL. d metodologia também de de Kumar et al 2016 com tempo de reação de 12 minutos em U/mL.

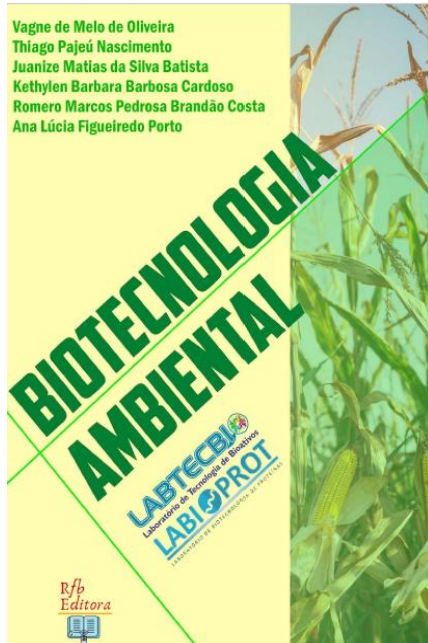
No trabalho de Kumar *et al* (2016), ele relata que a máxima produção de lacase por *Aspergillus flavus* (17,39 UI/mL) foi observada utilizando a fermentação submersa com 288 horas de cultura, sendo o resultado de produção com 72h de fermentação pelo *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 de 87,443 U/mL, obtendo um aumento na produção de aproximadamente 402% em um tempo menor de fermentação.

8. ANEXOS

Publicações Relacionadas

Capítulo de livro

- Lacases produzidas por microrganismos: uma revisão. *In: RFB EDITORA*, 2022. DOI: 10.46898/rfb.9786558892328.1



RESUMO

As lacases são enzimas pertencentes à família das oxidases multicobre, que catalisam a oxidação ambientalmente amigável de diferentes tipos de substratos aromáticos, juntamente com a redução direta do oxigênio molecular a água, sem formação de peróxido de hidrogênio intermediário. Além disso, lacases apresentam baixa especificidade em substratos, sendo aplicadas em vários processos, sobretudo de remediação de diversos tipos de contaminante, na degradação de corantes sintéticos de efluentes de indústrias têxteis e sucroalcooleiras no solo, na deslignificação de compostos celulósicos entre outros. A produção dessa classe de enzimas ocorre principalmente por microrganismos, bactérias e com maior destaque por meio de fungos filamentosos, que apresentam capacidade de produzir a enzima extracelularmente, seja por fermentação em estado sólido (FES), fermentação submersa ou estado semi-sólido. A produção de lacase é influenciada por diversos fatores como: condições da cultura, natureza e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, composição do meio, pH e temperatura. Sendo assim, esta revisão objetivou abordar os principais relatos da literatura sobre a produção de lacases de origem bacteriana e fúngicas, e constatou-se que as lacases obtidas por meio da fermentação em estado sólido de fungos filamentosos, na qual utiliza-se o íon cobre como indutor no meio para otimizar a produção são as que apresentam as maiores atividades enzimáticas com potencial para as mais diversas aplicações industriais.

Palavras-chave: Enzima. Fungos. Bactérias. Síntese. Otimização

ABSTRACT

Artigo Científico

- Seleção e produção de lacases a partir da fermentação em estado sólido de fungos filamentosos. *In*: REVISTA MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE, v. 3, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.51161/rem/s/3382>

Artigo Original

v. 3 n. 3 (2022)
ISSN: 2675-8008
Revista Multidisciplinar em Saúde

ACESSO ABERTO SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE LACASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Data de Recebimento:
21/04/2022

Data de Aceite:
13/08/2022

Data de Publicação:
17/08/2022

Revisor por:
Rubens Barbosa Rezende,
Cicera Kassiana Rodrigues

*Autor correspondente:
Romero Marcos Pedrosa Brandão
da Costa, Romero_brandao@yahoo.com.br

Citação:
FERREIRA, J. V. S et al.
Seleção e produção de
lacases a partir
da fermentação em estado
sólido de fungos
filamentosos. *Revista
Multidisciplinar em Saúde*,
v. 3, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.51161/rem/s/3382>

Julyanne Victória dos Santos Ferreira¹; Anna Gabrielly Duarte Neves²; Juanize Matias da Silva Batista³; Romero Marcos Pedrosa Brandão da Costa⁴; Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵;

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.

⁴ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife/PE.

⁵ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.

RESUMO

Introdução: As lacases são o grupo de enzimas mais amplamente estudado entre as oxidases, pois podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos usando oxigênio molecular como aceitador de elétrons. Além disso, usando mediadores de baixo peso molecular os substratos de lacase podem ser ampliados para incluir compostos não fenólicos. As lacases são aplicadas a nível industrial em diversos setores, na remediação de diversos tipos de contaminante, na degradação de corantes sintéticos de efluentes de indústrias têxteis e sucroalcooleiras no solo, na deslignificação de compostos celulósicos, entre outros. A produção dessa classe de enzimas